

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Martin Majer

**Produkce cytokinů u myši infikovaných ptačí schistosomou
*Trichobilharzia regenti***

Production of cytokines in mice infected with bird schistosome
Trichobilharzia regenti

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Tomáš Macháček

Praha 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 13. 8. 2018

.....

Martin Majer

Poděkování

Mé poděkování patří především školiteli Tomáši Macháčkovi. Po celou dobu studia mi byl nápomocen, kdykoliv jsem potřeboval a neúnavně mě zásoboval celou řadou cenných rad, nápadů a inspirativních myšlenek. Zároveň bych rád poděkoval Lucie Panské za trpělivost v mých začátcích, Petru Horákovi za mnoho věcných postřehů a možnost vůbec pracovat v laboratoři helmintologie a celému týmu za velmi přátelskou atmosféru. Také bych rád poděkoval Jozefu Jandovi a Míše Hájkové za pomoc a zasvěcení to tajů průtokové cytometrie. V neposlední řadě patří veliký dík osazenstvu Bambrbytu a dalším přátelům za vytváření pohody a zejména mé rodině za obrovskou podporu po dobu mého studia.

Abstrakt

Neuropatogenní motolice *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae) infikuje centrální nervovou soustavu ptáků a savců. Během své migraci míchou poškozují nervovou tkáň a vyvolávají zánět, který je při infekci savců patrně zodpovědný za eliminaci parazitů. Tato práce s využitím imunohistochemického značení detekovala v postižené míše myši C57BL/6J během infekce prozánětlivé cytokiny IL-1 β a IL-17. Zároveň však byly identifikovány i IL-4 a IL-6, které se patrně podílely na regulaci zánětu a poškození tkáně. Tyto cytokiny byly produkovány mikroglie a astrocyty, ale i dalšími neidentifikovanými buňkami. Reakce periferní imunitní odpovědi byla charakterizována na základě fenotypizace T lymfocytů ve slezině infikovaných myší pomocí průtokové cytometrie. Produkované cytokiny v době kulminace zánětu v míše vypovídaly o smíšené imunitní odpovědi (Th1/Th2). Výsledky této práce prohloubily znalosti o buněčné imunitní odpovědi myší při infekci *T. regenti* a potvrdily vliv zánětu v míše na polarizaci periferní imunitní odpovědi.

Klíčová slova: cytokiny, slezina, CNS, mikroglie, astrocyty, *Trichobilharzia regenti*, imunohistochemie, průtoková cytometrie

Abstract

The neuropathogenic trematode *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae) infects the central nervous system of birds and mammals. During its migration through the spinal cord, the parasite causes tissue damage and triggers inflammation which is likely responsible for the elimination of the parasite. In this thesis, the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-17 were detected by immunohistochemistry in the affected spinal cord of C57BL/6J mice during the infection. Additionally, IL-4 and IL-6, participating in the regulation of the inflammation and tissue repair, respectively, were noticed. Astrocytes, microglia and other, yet unidentified cells, produced these cytokines. Furthermore, splenic T-lymphocytes were phenotyped by flow cytometry to characterize peripheral immune response. At the peak of nervous tissue inflammation, mixed (Th1/Th2) cellular immune response was observed. Taken together, this thesis extended the knowledge of cytokine immune response of mice infected with *T. regenti* and also confirmed that inflammation in the nervous tissue influences the polarization of peripheral immune response.

Key words: cytokines, spleen, CNS, microglia, astrocytes, *Trichobilharzia regenti*, immunohistochemistry, flow cytometry

Obsah

1. Úvod a cíle práce.....	1
2. Literární přehled.....	2
2.1. Imunitní odpověď v CNS	2
2.2. Neurotropní helmintózy	2
2.3. Neurocysticerkóza.....	3
2.3.1. Neurocysticerkóza u lidí.....	3
2.3.2. Myší modely neurocysticerkózy	6
2.4. Neuroschistosomóza.....	8
2.5. Neurotoxokaróza	10
2.6. Neurotropní schistosoma <i>Trichobilharzia regenti</i>	11
3. Materiál a metodika.....	13
3.1. Modelový organizmus a experimentální infekce	13
3.1.1. <i>Trichobilharzia regenti</i>	13
3.1.2. Náhodní hostitelé a jejich infekce	13
3.2. Imunohistochemické experimenty	14
3.2.1. Transkardiální perfuze.....	14
3.2.2. Zpracování tkáně pro kryoseky a jejich zhotovení	14
3.2.3. Peroxidázové IHC značení	15
3.2.4. Imunofluorescenční IHC značení.....	16
3.2.5. Ověření přítomnosti schistosomul v míše	18
3.3. Cytometrické experimenty	19
3.3.1. Získání splenocytů a jejich stimulace.....	20
3.3.2. Příprava vzorků pro průtokovou cytometrii	21
3.3.3. Měření na průtokovém cytometru	22
3.4. Statistika.....	23
4. Výsledky	24
4.1. IHC experimenty.....	24
4.1.1. Cytokiny 3 dpi.....	25
4.1.2. Cytokiny 7 dpi.....	27
4.1.4. Cytokiny 14 dpi.....	33

4.1.5. Cytokiny 21 dpi.....	36
4.1.6. Shrnutí IHC výsledků.....	39
4.2. Cytometrické experimenty	40
4.2.1. Gatovací strategie.....	40
4.2.2. Hmotnost sleziny a celkové počty izolovaných T lymfocytů	42
4.2.3. Dynamika CD4+ populací v průběhu infekce.....	43
4.2.4. Dynamika CD4- populace během infekce.....	49
4.2.5. Shrnutí výsledků z cytometrie.....	51
5. Diskuze.....	52
5.1. Migrace <i>T. regenti</i> v myších C57BL/6J a reakce gliových buněk	52
5.2. Cytokiny v okolí schistosomul v CNS	55
5.3. Periferní imunitní odpověď	58
6. Závěr	61
7. Použitá literatura	62
8. Přílohy	70
8.1. IHC experimenty	70
8.2. Cytometrické experimenty	72

Seznam zkratek

BFA	brefeldin A
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
CD	diferenciační skupina (z angl. cluster of differentiation)
ck	centrální kanál
CNS	centrální nervový systém
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
dpi	dny po infekci
GFAP	kyselý gliový fibrilární protein (z angl. glial fibrillary acidic protein)
gm	šedá hmota (z angl. grey matter)
Iba-1	mikroglialní protein vázající vápník (z angl. ionized calcium-binding adapter molecule)
IFN	interferon
IHC	imunohistochemie
IL	interleukin
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. major histocompatibility complex)
Mon	monensin
NCC	neurocysticerkóza
NK	„přirození zabíječi“ (z angl. natural killer)
PBMC	mononukleární buňky periferní krve (z angl. peripheral blood mononuclear cells)
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
RCA I	<i>Ricinus communis</i> agglutinin I
sm	submeningeální
TF	transkripční faktor
TGF	transformující růstový faktor (z angl. transforming growth factor)
Th	pomocné T lymfocyty (z angl. T helper)
TNF α	tumor nekrotizující faktor α
Treg	regulační T lymfocyty
wm	bílá hmota (z angl. white matter)

1. Úvod a cíle práce

Centrální nervová soustava (CNS) je vzhledem k omezené možnosti regenerace citlivá na jakékoliv poškození, působení parazitárních organismů nevyjímaje. Je popsána celá řada infekcí CNS různými životními stádii helmintů (např. *Taenia solium*, *Angiostrongylus cantonesis*, *Echinococcus granulosus*, *Toxocara canis* a *cati*, nebo lidskými schistosomami) ale i jednobuněčnými parazity (*Toxoplasma gondii* *Plasmodium falciparum*, *Neogleria fowleri*, nebo africkými trypanosomami) (Finsterer & Auer, 2013).

Tyto organizmy poškozují hostitelovu tkáň svými exkrečně/sekrečními produkty nebo mechanicky svojí migrací a růstem. To samozřejmě vyvolává imunitní reakci hostitele, která pro něj v případě nedostatečné regulace může být fatální. Imunitní odpovědi v CNS se účastní jak rezidentní gliové buňky (mikroglie a astrocyty) tak i řada leukocytů infiltrujících z periferní krve. Pro regulaci aktivace a migrace periferních i rezidentních buněk jsou klíčové jimi produkované cytokiny.

Ačkoliv význam neurotropních helmintů pro lidské zdraví je neoddiskutovatelný, poznatky o jimi imunitní odpovědi nejsou dostatečné i vzhledem k omezenému množství vhodných laboratorních modelů.

V této práci bude proto charakterizována buněčná imunitní odpověď náhodných savčích hostitelů na neurotropní schistosomu *Trichobilharzia regenti* na základě odezvy buněk v CNS a výskytu vybraných cytokinů. Následně bude posouzen vliv této reakce na periferní imunitní odpověď.

Cíle této práce jsou:

- Popsat v čase migraci schistosomul *T. regenti* v míše myši C57BL/6J a reakci astrocytů a mikroglíí na infekci.
- Lokalizovat během infekce v nervové tkáni vybrané cytokiny typické pro prozánětlivou a protizánětlivou imunitní odpověď.
- Charakterizovat v průběhu infekce ve slezině základní populace T lymfocytů jakožto významných producentů cytokinů.

2. Literární přehled

2.1. Imunitní odpověď v CNS

Centrální nervová soustava (CNS) je izolována od buněk periferního imunitního systému hematoencefalickou bariérou, a v minulosti byla dokonce považována za imunoprivilegovaný orgán. Tato hypotéza byla ovšem překonána, ačkoliv vzhledem k omezené regeneraci poškození tkáně vzniklé zánětlivým působením je imunitní odpověď v CNS přísně regulována (Louveau et al., 2015). Prezentace antigenů v CNS je omezena na jejich transport do spádových lymfatických uzlin anebo jejich prezentaci rezidentními antigen-prezentujícími buňkami, např. mikroglie či mozgovými dendritickými buňkami (D'Agostino et al., 2012).

Mikroglie jsou myeloidní buňky tvořící první obranou linii CNS. Tyto buňky v případě infekce či poškození tkáně proliferují a fagocytují jednobuněčné patogeny či buněčnou debris (Streit & Kreutzberg, 1988; Mariani & Kielian, 2009). Aktivované mikroglie se také podílejí na tvorbě oxidu dusnatého, který je toxický pro parazity, ale i neurony (Boje & Arora, 1992).

Z imunologického hlediska jsou z rezidentních buněk CNS významné i astrocyty, které se podílí tvorbou *glia limitans* na stavbě hematoencefalické bariéry. Při zánětu v nervové tkáni a degeneraci neuronů astrocyty hypertrofují, obklopují společně s mikroglie zasažené místo a vytváří gliovou jizvu (Streit & Kreutzberg, 1988; Sofroniew & Vinters, 2010).

Kromě toho jsou jak astrocyty, tak mikroglie významným zdrojem cytokinů, čímž aktivně regulují probíhající imunitní odpověď v postižené nervové tkáni (Hanisch, 2002; Choi et al., 2014). Produkce cytokinů těmito buňkami bude, s ohledem na zaměření této práce, rozvedena dále v kontextu helmintárních neuroinfekcí.

2.2. Neurotropní helmintózy

CNS savců, včetně člověka, může být napadena řadou neurotropních helmintů (Finsterer & Auer, 2013). Nákaza může mít různou podobu: od asymptomatické infekce po život ohrožující stavy. Při napadení CNS může docházet k nevratnému poškození nervové tkáně, ať už působením exkrečně-sekrecních produktů samotných parazitů nebo efektorových molekul imunitního systému hostitele. Na patologii se může podílet i mechanické poškození tkáně vyvolané migrací makroskopického patogenu, který ji navíc může využívat jako zdroj potravy.

V následujících kapitolách bude popsána buněčná imunitní odpověď při nejčastějších lidských neurotropních helmintozách (příp. u zvířecích modelů těchto infekcí): neurocysticerkóze, neuroschistosomóze a neurotoxokaróze. Dále bude představen laboratorní model neurotropní motolice *Trichobilharzia regenti*, s níž byla prováděna praktická část této práce.

2.3. Neurocysticerkóza

Jako neurocysticerkózu (NCC) označujeme ektopickou lokalizaci larválních stadií (cysticerků) tasemnice *T. solium* v CNS savců. Nejčastěji jde o prasata (typické meziphostitele), NCC může ale postihnout i člověka, pokud se nakazí vajíčky *T. solium*.

2.3.1. Neurocysticerkóza u lidí

Cysticerky byly u lidí nejčastěji pozorovány v subarachnoidálních prostorech, méně často pak v parenchymu nebo mozkových komorách (Chavarria et al., 2006). Lidská NCC je často diagnostikovaná náhodně v asymptomatické fázi, kdy cysticerky bývají již kalcifikované, takže nedochází ke kontaktu jejich antigenů s tkání hostitele a rozvoji zánětu (Chavarria et al., 2005, 2006). Podobně benigními se jeví i živé, nepoškozené cysticerky, kolem nichž se obvykle netvoří zánětlivý infiltrát (Restrepo et al., 1998). Nejzávažnější patologické stavy, jako jsou epileptické záchvaty a další neurologické obtíže, byly pozorovány v případech degenerujících cysticerků.

Případů NCC s degenerujícím cysticerkem je popsáno o mnoho více. Kolem poškozeného parazita se vytváří granulom prostoupený kolagenními vlákny a zejména mikroglie/makrofágy, často MHC II+ (Restrepo et al., 2001; Alvarez et al., 2002). V menších počtech byly v granulomech zastoupeny lymfocyty, plazmatické buňky, neutrofilové a eozinofily (Restrepo et al., 1998, 2001). Okolo těchto granulomů byly hypertrofované astrocyty, které se podílely na tvorbě gliové jizvy izolující zánětlivé ložisko od zdravé tkáně (Alvarez et al., 2002).

V granulomech či přilehlé nervové tkáni byly detekovány jak prozánětlivý interleukin (IL)-18 (Restrepo et al., 2001; Alvarez et al., 2002), tak IL-4 (Restrepo et al., 2001) typický pro pomocné T lymfocyty 2. typu (Th, z angl. T helper). Smíšenou imunitní odpověď potvrzuje i výskyt dalších prozánětlivých cytokinů (např. IL-2, IL-12 a interferon γ (IFN γ)) a zároveň transformujícího růstového faktoru β (TGF β , z angl. transforming growth factor) a IL-10 (Restrepo et al., 1998, 2001; Alvarez et al., 2002),

což jsou významné imunoregulační cytokiny (Kulkarni et al., 1993; Groux et al., 1997). Jaké buňky tyto cytokiny produkovaly, však není jasné, jelikož autoři pro jejich identifikaci používali obvykle pouze nedostatečná morfologická kritéria, a ne např. dvojité imunofluorescenční značení,

Známky akutního zánětu probíhajícího v okolí parazita byly rozpoznatelné i v likvoru pacientů, kde bylo ve srovnání s asymptomatickými pacienty větší množství eozinofilů a vyšší koncentrace IL-5. Byly ale pozorovány i známky smíšené imunitní odpovědi, a to v podobě vyššího množství prozánětlivého IL-6 a zároveň regulačního IL-10 (Rodrigues et al., 2000; Chavarria et al., 2005), jehož zdrojem jsou s velkou pravděpodobností regulační T lymfocyty (Treg), jejichž množství v likvoru je u pacientů s NCC vyšší než v případě zdravých lidí (Arce-Sillas et al., 2016). Množství infiltrujících zánětlivých buněk a hladinu produkovaných cytokinů patrně ovlivňuje lokalizace cysticerek v mozku. Pokud byly cysticerky lokalizovány u báze subarachnoidálního prostoru nebo mozkových komorách, tedy v bližším kontaktu s likvorem, byly hladiny cytokinů a míra infiltrace vyšší. Naproti tomu v případě parenchymální lokalizace byly počty infiltrujících zánětlivých buněk i hladina cytokinů nižší, což korelovalo s mírnějšími klinickými projevy (Chavarria et al., 2005).

Imunitní reakce vyvolaná přítomností cysticerek v mozku ovlivňuje i periferní imunitní odpověď. Nicméně jak správně upozorňují Uddin et al. (2010), výsledky mohou být ovlivněny zanesením cysticerek i do dalších orgánů kromě CNS. Podobně jako je tomu v likvoru, i v periferní krvi se v případě NCC zvyšuje zastoupení Treg buněk, ačkoliv celkové zastoupení buněk diferenciací skupiny 4+ (CD; z angl. cluster of differentiation) i CD8+ buněk se oproti zdravým lidem nemění (Adalid-Peralta et al., 2012; Arce-Sillas et al., 2016). Tomu odpovídá i zvýšené množství regulačního IL-10 (Arce-Sillas et al., 2016), ačkoliv tento stav je typický pravděpodobně spíše pro asymptomatické nákazy, kdy je v periferní krvi vyšší i hladina IL-4 (Verma et al., 2011). Imunitní odpověď v periferní krvi symptomatických jedinců naopak vykazovala spíše prozánětlivou Th1 odpověď. O čemž vypovídala přítomnost tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF α), IFN γ , IL-17 a IL-23 (Verma et al., 2011). Vyšší sérové hladiny těchto cytokinů, ale i již zmíněného IL-4 nebo IL-13, byly u pacientů s cysticerky v mozковém parenchymu v porovnání s jejich přítomností v subarachnoidálním prostoru. Což může být způsobeno bližším kontaktem antigenů cysticerek s periferním imunitním systémem, a tak vyšším vlivem regulačních molekul, které parazit produkuje (Tuero et al., 2015).

Proliferace mononukleárních buněk periferní krve (PBMC, z angl. peripheral blood mononuclear cells) symptomatických pacientů byla snížena po stimulaci homogenátem viabilních cysticerků získaných ze svaloviny experimentálně nakažených prasat v porovnání s buňkami izolovaných z pacientů s mírnými nebo žádnými symptomy. Vzhledem k tomu, že při stimulaci buněk symptomatických pacientů mitogenem konkanavalin A byla jejich proliferace vyšší, tak lze předpokládat, že buňky byly imunoresponsezivní, ale antigeny obsažené v cysticerku tlumí proliferaci buněk pacientů, kteří přicházejí do styku s obsahem degenerujících cysticerků typicky při symptomatickém průběhu NCC (Chavarria et al., 2006). To nasvědčuje hypotéze, že živé cysticerky uvolňují ze své stěny do okolní tkáně imunomodulační látky tlumící zánět. Již výše bylo uvedeno, že kolem živých cysticerků není (na rozdíl od těch degradujících) pozorován zánětlivý infiltrát. Tento protektivní efekt ovšem není trvalý a s rozvojem hostitelovy imunitní odpovědi postupně mizí a cysticerkus začíná degenerovat. Amit et al., (2011) prokázali, že tekutina obsažená v cysticerku, která se po jeho poškození uvolňuje, zvyšuje proliferaci PBMC u jinak asymptomatických pacientů.

PBMC asymptomatických jedinců po stimulaci homogenátem celých cysticerků i pouze cystickou tekutinou vykazovaly zvýšenou produkci cytokinů spjatých převážně s Th2 (IL-4, IL-5 a IL-13) (Chavarria et al., 2003, 2006; Amit et al., 2011) a Treg (IL-10) (Prasad et al., 2009; Amit et al., 2011) v porovnání se symptomatickými pacienty. Minimálně produkce Th2 cytokinů byla pravděpodobně ovlivněna dlouhodobým působením parazitárních antigenů na buňky před jejich izolací z pacientů. Hladiny IL-4, IL-5 a IL-13 totiž byly vyšší i než v případě shodné stimulace PBMC naivních jedinců. (Chavarria et al., 2003). V případě stimulace PBMC asymptomatických pacientů byly produkovány částečně i cytokiny spjaté s Th1 (Chavarria et al., 2006; Amit et al., 2011). Nicméně jejich převaha byla patrná zejména u symptomatických pacientů, kdy byla pozorována zvýšená produkce IL-1 β , IL-2, IFN γ i TNF α (Prasad et al., 2009).

Homogenát cysticerků stimuloval monocyty ze zdravých jedinců k produkci chemokinu IL-8 (= CXCL8) (Uddin et al., 2005), jenž je důležitý pro atrakci neutrofilů (De Buck et al., 2015). Ty bývají prvními buňkami vrozeného imunitního systému účastníci se potlačení patogenů a byly pozorovány v CNS infikované cysticerky *T. solium*. Médium s produkty takto aktivovaných monocytů společně s antigeny celých cysticerků stimulovalo astrocyty a neutrofilů k produkci prozánětlivého cytokinu TNF α (Uddin et al., 2005). Při stimulaci jednotlivými frakcemi cysticerku se ukázalo, že produkci IL-8 monocyty na rozdíl od ostatních výše zmíněných cytokinů nestimulovaly

antigeny v cystické tekutině, ale hlavně antigeny membrány cysticerku (Uddin et al., 2010). To by nasvědčovalo připravenosti vrozené části imunitního systému k rychlé reakci proti viabilním cysticerkům, které mají patrně schopnost inhibovat T buněčnou imunitní odpověď, jak bylo naznačeno výše. *In vivo* se však zvýšená hladina IL-8 v séru pacientů s NCC nepotvrdila, byla dokonce nižší než u zdravých jedinců (Uddin et al., 2010). To může být způsobeno delším trvání infekce a lze předpokládat, že zvýšená produkce IL-8 by byla patrná jen v časně fázi infekce.

Vzhledem k těmto výsledkům se lze domnívat, že v případě symptomatické NCC, kdy parazit degeneruje a hostitel přichází do styku s obsahem cystické tekutiny, převažuje zánětlivá Th1 odpověď. Tato reakce může být s velikou pravděpodobností zodpovědná za řadu patologických stavů. V případě asymptomatické NCC, typické především pro fázi, kdy jsou cysticerky kalcifikované, je naopak zánětlivá reakce tlumena Th2 a Treg cytokiny.

2.3.2. Myší modely neurocysticerkózy

Ačkoliv případů lidské NCC je popsáno relativně veliké množství, nelze u nich zjistit délku trvání nákazy a v řadě studií nelze vyloučit ani ovlivnění imunitního systému dalšími cysticerky vyskytujícími se mimo CNS. Většinou také není přesně známa minulost pacientů a vliv dříve prodělaných onemocnění. Proto byl pro studium NCC vyvinut model, ve kterém jsou myši nakaženy metacestody tasemnice *Mesocestoides corti*, jež je příbuzná *T. solium*. Metacestodi (tetrathyridia) jsou asepticky izolováni z peritoneální dutiny chovné myši a následně jsou vpraveni do hostitele intrakraniální injekcí. Jedná o invazivní zákrok, neinfikovaným myším je tedy většinou jako kontrola stejným způsobem injikován fyziologický roztok. Díky tomu je možné lépe popsat imunitní odpověď v CNS i v časných fázích symptomatické infekce. Tento postup, zavedený Cardonou et al. (1999), je dosud nejčastěji využívaným a nejvíce studovaným zvířecím modelem NCC (Alvarez et al., 2010; Arora et al., 2017).

Metacestodi po intrakraniální inokulaci migrují do extraparenchymálních oblastí, jako jsou mozkové komory a subarachnoidální nebo leptomeningeální prostory. Při infekci imunokompetentních myší (BALB/c a C57BL/6) se jich pak většina přesouvá do mozkového parenchymu (Cardona et al., 1999; Cardona & Teale, 2002). Infekce se u těchto myší projevuje třasem, poruchami koordinace, ztrátou váhy a končí smrtí (Cardona & Teale, 2002).

V extraparenchymálním prostoru byl v časné fázi infekce pozorován infiltrát buněk okolo parazita i mimo něj tvořený hlavně γ/δ T lymfocyty a makrofágy, velmi často MHC II+. Později bylo detekováno i menší množství α/β T lymfocytů, zejména CD4+. V parenchymu byl buněčný infiltrát slabší, objevil se později po infekci a v některých případech vůbec. Byl tvořen zejména mikroglie/makrofágy, často opět MHC II+. Částečně byly přítomny i γ/δ T lymfocyty a CD4+ buňky. V některých případech byly shluky mikroglie/makrofágů a T lymfocytů pozorovány i v místech parenchymu, kdy nebyl parazit přítomný. Autoři předpokládají, že to mohou být místa, kudy migroval (Cardona et al., 1999).

Uvedené buňky od počátku infekce prostupovaly do mozkové tkáně z periferní krve skrze piální cévy v extraparenchymálním prostoru a choroidální plexus (tudy prostupovaly buňky do parenchymu v malém množství i u zdravých myši). V pozdější fázi infekce se zvýšila propustnost hematoencefalické bariéry a buňky se dostávaly do tkáně i skrze parenchymální cévy. S narušením hematoencefalické bariéry a vzrůstajícím počtem infiltrovaných buněk korelovala hypertrofizace astrocytů obalujících parenchymální cévy a tvořících bariéru *glia limitans*, která odděluje mozkový parenchym od extraparenchymálních prostor (Alvarez & Teale, 2006).

Hypertrofované astrocyty produkovaly ve velkém množství IL-6 (Alvarez & Teale, 2006), který je významný při tvorbě gliové jizvy a hojení poškozené CNS (Swartz et al., 2001). V mozkovém parenchymu byly pozorovány i prozánětlivé cytokiny (IL-2, IL-12 a $\text{IFN}\gamma$), které byly však majoritně produkovány γ/δ T lymfocyty a makrofágy v časnější fázi infekce v extraparenchymálních prostorech. V pozdějších fázích infekce byly v těchto místech patrné i IL-4 a IL-10, ale ve výrazně menším množství (Cardona et al., 1999). Tyto výsledky svědčí o produkci zmíněných cytokinů reagujících na přítomnost parazita zejména buňkami infiltrujícími se do místa infekce z periferní krve.

Jelikož jednou z významně zastoupených populací v zánětlivém infiltrátu byly γ/δ T lymfocyty, zaměřili se Cardona & Teale (2002) na porovnání $\text{TCR}\delta^{-/-}$ myši a myši imunokompetentních. $\text{TCR}\delta^{-/-}$ myši měly výrazně méně parazitů v mozkovém parenchymu a v jejich okolí nebyla na rozdíl od imunokompetentních myši pozorovány patologické změny. Naopak většina metacestodů byla lokalizována extraparenchymálně a docházelo dokonce k jejich zanesení do jater nebo peritoneálního prostoru. Deficientní myši nevykazovaly závažné neurologické potíže a přeživaly déle než ty imunokompetentní. Na tom se kromě nižšího počtu parazitů v parenchymu mohly podílet

také menší buněčné infiltráty v infikované CNS a vyvážený podíl produkovaných Th1 a Th2 cytokinů (IL-2, IL-12 a IFN γ v porovnání s IL-4 a IL-13).

Lehčí neuropatologické projevy a nižší úmrtnost myši byly pozorovány i u MyD88^{-/-} myši a korelovaly se sníženou produkcí prozánětlivých TNF α a IFN γ v nervové tkáni a velice nízkou produkcí IL-6 perivaskulárními astrocyty. Mikroglie/makrofágy, γ/δ T lymfocyty i α/β T lymfocyty se v infikované CNS vyskytovaly, ale opět byly společně s dalšími buňkami v nižších počtech než u imunokompetentních myši (Mishra et al., 2009).

Méně do mozku infiltrovaných buněk však bylo i v případě infekce STAT6^{-/-} myši s narušenou signalizací vedoucí k Th2 diferenciaci. Neurologické obtíže zde byly vážnější a úmrtnost myši vyšší. Důvodem byl pravděpodobně více parazitů v mozkovém parenchymu a zánětlivý infiltrát okolo nich, opět tvořený mikroglie/makrofágy (Mishra et al., 2011).

Výsledky z modelu NCC nákazou myši metacestody *M. cortii* nasvědčují, že patologii onemocnění ovlivňuje jednak lokalizace parazitů v mozku a zároveň imunitní odpověď vůči němu. Té se účastní jak rezidentní buňky CNS (mikroglie a astrocyty), tak buňky infiltrované z periferní krve (lymfocyty a makrofágy). Akumulace buněk v mozkovém parenchymu může být pro hostitele fatální, i když není početná, ale vykazuje zánětlivou Th1 reakci. Data z myších modelů tedy potvrzují pozorování z klinických případů u lidí, že na vývoj infekce a stav hostitele mají vliv jak lokalizace parazita, tak polarizace imunitní odpovědi.

2.4. Neuroschistosomóza

Hlavním patogenním agens jsou při infekci lidí motolicemi rodu *Schistosoma* vajíčka. Veliká část z nich neopouští hostitele, ale usazuje se ve vnitřních orgánech. Predilekčně k jejich akumulaci dochází v játrech, avšak hematogenním rozsevem se mohou dostat i do CNS – tehdy hovoříme o neuroschistosomóze. Při nákaze *S. mansoni* a *S. haematobium* je obvykle postižena mícha, v případě *S. japonicum* i mozek.

Primárních publikací o neuroschistosomóze je velmi málo. Většina z nich jsou případové studie věnující se popisu klinických příznaků, možnosti diagnostiky a terapii tohoto onemocnění u lidí. I když se několik z nich věnuje i buněčné imunitní odpovědi, je třeba brát v úvahu ovlivnění imunitního systému dospělci a vajíčky parazita ve své přirozené lokalizaci a zároveň většinou vliv léků, které se při tomto onemocnění užívají.

Situaci ztěžuje i skutečnost, že myší model neuroschistosomózy, založený na intrathekální injekci vajíček, byl zaveden teprve loni a imunologické parametry infekce nebyly v centru zájmu jeho autorů (De Santana et al., 2017).

Míšní schistosomóza se často projevuje bolestmi v bederní oblasti a někdy i částečným ochrnutím (Sousa-Pereira et al., 2006), cerebrální forma onemocnění pak většinou bolestmi hlavy a v některých případech i epileptickými záchvaty (Lei et al., 2008). Vzhledem k údajům v předchozí kapitole lze předpokládat, že i v tomto případě projevy onemocnění nejsou způsobeny jen samotnou přítomností parazita v CNS, ale významně se na nich podílí i imunitní systém hostitele. Vajíčka při cerebrální schistosomóze byla obklopena nekrotickou tkání, lymfocyty, plasmatickými buňkami a mnohояadernými syncytiálními buňkami. Okolo těchto útvarů byla pozorována akumulace velikého množství eozinofilů (Lei et al., 2008).

Eozinofily byly společně s lymfocyty nejpočetnějšími buněčnými populacemi v likvoru pacientů s míšní schistosomózou, kdy bylo pozorováno celkově zvýšené množství buněk v likvoru v porovnání se zdravými jedinci (Ferrari et al., 2004). Na aktivaci eozinofilů se mohly podílet chemokiny eotaxin 1 a 2 (Provost et al., 2013), které byly ve zvýšené míře pozorovány v séru pacientů. Nicméně v likvoru nebyl v porovnání se zdravými jedinci žádný signifikantní rozdíl. Tento výsledek mohl být tedy ovlivněn výskytem vajíček i v jiných orgánech, jelikož vysoké hladiny těchto chemokinů autoři pozorovali i v případě lokalizace vajíček schistosom pouze v játrech (Sousa-Pereira et al., 2006). V likvoru pacientů s míšní schistosomózou nebyla pozorována ani zvýšená hladina cytokinu IL-5 (Ferrari et al., 2006; De Almeida Kruschewsky et al., 2016), který je také významný pro proliferaci eozinofilů (Sher et al., 1990).

V likvoru i séru pacientů s vajíčky v míše byly také pozorovány vysoké hladiny IL-4, IL-6, IL-10 (Ferrari et al., 2006) a IL-13 (Sousa-Pereira et al., 2006; De Almeida Kruschewsky et al., 2016). Ačkoliv v těchto případech byla detekována i zvýšená koncentrace IL-1 β , lze předpokládat, že Th1 odpověď byla spíše tlumena, jelikož hladina cytokinu IFN γ negativně korelovala s výskytem regulačního IL-10 (Ferrari et al., 2006). Cytokinový profil tedy nasvědčoval spíše Th2 a Treg odpovědi, podobně je tomu v případě imunitní odpovědi splenocytů imunokompetentních myší na antigeny vajíček (Fallon et al., 2000). Tato data tedy nasvědčují podobnému průběhu jako v případě lokalizace vajíček v játrech, která je pro schistosomózu typičtější, a to tvorbě granulomu spjatého s Th2 odpovědí (Seki et al., 2012; Chuah et al., 2016).

2.5. Neurotoxokaróza

Střevní hlístice *Toxocara canis* nebo *T. cati* parazitující v šelmách mohou nakazit i člověka. Jejich larvy pak migrují tělem hostitele, aniž dospějí, a jedním z míst postižených jejich migrací může být i CNS. Lidských případů s potvrzenou symptomatickou neurotoxokarózou však bylo celosvětově popsáno jen zhruba 100 (Deshayes et al., 2016), infekce CNS nejspíš obvykle probíhá asymptomaticky. Některé studie založené na epidemiologických datech ovšem naznačují spojitost (neuro)toxokarózy a epilepsie (Bächli et al., 2004), tedy podobně jako v případě NCC. Jiní na základě dat z myších modelů spekulují o možnosti, že neurotoxokaróza za určitých podmínek vede k rozvoji Alzheimerovy choroby (Fan et al., 2015).

U experimentálně infikovaných myší je však migrace larev do CNS poměrně běžným jevem (Epe et al., 1994) a dochází u nich i k behaviorálním změnám (Janecek et al., 2017). Již v prvních dnech po infekci byly larvy pozorovány poblíž choroidálního plexu a jejich množství se v průběhu infekce zvyšovalo (Liao et al., 2008; Othman et al., 2010). Vzhledem k jejich migraci krevním řečištěm lze předpokládat, že právě choroidální plexus je jedno z míst, kudy vstupují do CNS. V těchto oblastech mozku byla následně pozorována hypertrofizace astrocytů a zvyšující se množství enzymu inducibilní syntáza oxidu dusnatého v gliových buňkách (Othman et al., 2010). Larvy mozem aktivně migrovaly a nebyly zastaveny buňkami imunitního systému (Othman et al., 2010), ani v jejich okolí nebyl pozorován infiltrát leukocytů z periferní krve (Liao et al., 2008). Důvodem může být aktivní migrace larev nervovou tkání, na rozdíl od pasivně usazených cysticerků tasemnice či vajíček schistosom.

V průběhu infekce byla v mozku pozorována zvyšující se exprese mRNA pro cytokin IL-6 (Othman et al., 2010), podílející se na hypertrofizaci astrocytů (Swartz et al., 2001). V prvních dnech byla v mozku nejvyšší hladina cytokinu $IFN\gamma$, která postupně klesala (Hamilton et al., 2008). Na druhou stranu postupně narůstala exprese prozánětlivého $TNF\alpha$ (Othman et al., 2010). Po celou dobu infekce bylo ovšem v mozku pozorováno i vysoké množství imunoregulačních cytokinů IL-10 (Hamilton et al., 2008) a $TGF\beta$ (Liao et al., 2008).

V případě infekcí myšího kmene NIH rezistentního k larvální toxokaróze se v mozku nacházelo méně parazitů a jejich množství v průběhu infekce klesalo (Hamilton et al., 2006). Nižší infestace u těchto myší měla pravděpodobně vliv i na nižší hladiny

cytokinů IL-5, IL-10 a IFN γ v mozku v porovnání s kmenem BALB/c vnímavým k toxokaróze (Hamilton et al., 2008).

Imunitní odpověď při neurotoxokaróze není dostatečně charakterizována, ale nelze vyloučit její vliv na patogenezi u symptomatických pacientů. Ačkoliv je prováděn výzkum na myších, není známo, nakolik odpovídá průběhu infekce u lidí a publikovaných výsledků není mnoho.

2.6. Neurotropní schistosoma *Trichobilharzia regenti*

Perspektivním modelem pro výzkum neurotropních helmintóz je také ptačí schistosoma *T. regenti*. Jejím definitivním hostitelem jsou kachnovití ptáci, nicméně může infikovat i savce, včetně myší. V obou případech parazit penetruje do kůže obratlovčího hostitele ve vodním prostředí a následně larvální stádium (schistosomulum) migruje podél periferních nervů do míchy a skrze tu posléze do mozku. Při infekci myší (náhodných hostitelů) nejpozději zde hyne, u kachen (definitivních hostitelů) pokračuje dále do nosní sliznice, kde dospívá (Hrádková & Horák, 2002). Migrace parazita CNS definitivních i náhodných hostitelů může způsobovat jejich částečné ochrnutí (Horák et al., 1999).

Podobně jako v případě myšího modelu NCC (Cardona et al., 1999; Cardona & Teale, 2002) se schistosomula *T. regenti* v imunokompetentních myších (BALB/c a C57BL/6) častěji nacházejí v bílé hmotě míšního parenchymu (Kouřilová et al., 2004a; Bulantová et al., 2016). Jejich dominantně extraparenchymální lokalizace v imunodeficientních myších (SCID) (Kouřilová et al., 2004a) nasvědčuje migraci parazitů do parenchymu z důvodu úniku před imunitní odpovědí.

Infekce je na rozdíl od NCC a neurotoxokarózy, kdy se také v CNS nacházejí larvální stádia helmintů, perkutánní. Proto je potřeba při vyhodnocování výsledků brát v potaz, že přibližně 90 % všech schistosomul po penetraci do imunokompetentních myší bylo zachyceno v kůži a CNS nedosáhlo (Hrádková & Horák, 2002). Úspěšnost schistosomul při infekci a migraci do CNS byla pravděpodobně potlačena imunitním systémem hostitele, jelikož v případě infekcí imunodeficientních myší (SCID) byl počet schistosomul invadujících CNS vyšší (Hrádková & Horák, 2002; Kouřilová et al., 2004a).

Kolem poškozených schistosomul se v kůži imunokompetentní myši BALB/c tvořil zánětlivý infiltrát neutrofilů, makrofágů, CD4⁺ lymfocytů a žírných buněk produkujících prozánětlivé cytokiny IL-1 β , IL-6 a IL-12 (Kouřilová et al., 2004b). Podobné buněčné zastoupení měl i infiltrát okolo degenerujících parazitů v míše, ale

s převahou mikroglií/makrofágů. Ovšem tyto buňky se nacházely, ač v omezené míře, okolo parazitů i v časnějších fázích infekce, kdy se ještě jeví jako intaktní (Kouřilová et al., 2004a; Lichtenbergová et al., 2011). Okolo degenerujících parazitů a v jejich migrační stopě docházelo kromě akumulace zmíněných buněk i k hypertrofizaci astrocytů (Lichtenbergová et al., 2011) a tvorbě gliové jizvy. Na uvedenou buněčnou imunitní odpověď mělo pravděpodobně vliv i poškození neuronů. Jelikož reakce byla patrná až v době, kdy byly pozorovány porušené axony (Lichtenbergová et al., 2011) a další blíže nespécifikované patologické změny neuronů (Kolářová et al., 2001).

Cytokinová odpověď v CNS známá není, ale byla prokázána produkce IL-6 astrocyty izolovanými ze zdravých myší při jejich stimulaci parazitárními antigeny. Ty dokáží stimulovat nejen astrocyty, ale i mikroglie k produkci TNF α a oxidu dusnatého, což svědčí o zánětlivé reakci na sekreční produkty parazita i jeho homogenátu. Tuto hypotézu podporuje i to, že použité antigeny nestimulovaly mikroglie ani astrocyty k produkce imunoregulačních cytokinů IL-10 a TGF β (Macháček et al., 2016).

Dosud známé výsledky naznačují, že na usmrcení parazita má zásadní vliv prozánětlivá odpověď hostitele. Nicméně publikací věnující se tomuto tématu není mnoho a vliv zánětu v míše, způsobeného degradujícím schistosomulem, na periferní imunitní odpověď v pozdějších fázích infekce není znám vůbec.

3. Materiál a metodika

3.1. Modelový organizmus a experimentální infekce

3.1.1. *Trichobilharzia regenti*

Modelový organizmus *Trichobilharzia regenti* je dlouhodobě chován v helmintologické laboratoři Katedry parazitologie (Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova; PřF UK) s využitím kachny *Anas platyrhynchos* f. *domestica* jako definitivního hostitele a plže *Radix lagotis* jako mezihostitele. Za účelem získání cercárií pro infekci myši (viz dále), byli plži v nádobě s odstátou vodou nasvíceni lampou po dobu 60 minut, což stimulovalo vylučování cercárií. Ty byly následně koncentrovány na základě své pozitivní fototaxe u nasvíceného hrdla odměrné baňky jinak zakryté alobalem. Odtud byly cercárie přeneseny Pasteurovou pipetou do 50ml zkumavky. Koncentrace cercárií (ml^{-1}) byla stanovena po jejich spočtení ve dvaceti 50 μl vzorcích odebraných ze zásobní zkumavky a následně byl odebrán objem obsahující požadovanou infekční dávku.

3.1.2. Náhodní hostitelé a jejich infekce

Jako náhodný savčí hostitel parazita byly zvoleny samice myši kmene C57BL/6JOlaHsd (ENVIGO) chované ve vyhrazené konvenční kóji (23 °C, vzdušná vlhkost 55 %, světelný režim 12/12, přístup ke krmení a vodě *ad libitum*) v Centru pro experimentální biomodely (1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova). Před infekcí byly myši jednotlivě umístěny na 30 min do zatemněné 0,5l kádinky s 50 ml vody o teplotě 40 °C k defekaci a urinaci. Poté byla voda vyměněna za 50 ml odstáté vody s 1500–2000 cercáriemi, ve které byly myši ponechány 60 min. Po infekci byly myši vráceny do boxů a usmrceny byly 3, 7, 14 a 21 dní po infekci (dpi) metodou zvolenou s ohledem na další zpracování (viz dále). Nenakažené myši (značené „0 dpi“) byly vždy použity jako biologické negativní kontroly.

Práce se zvířaty probíhala pod dozorem držitele osvědčení o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů podle § 15d odst. 3 zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. Všechny experimentální postupy zahrnující laboratorní zvířata byly schváleny Odbornou etickou komisí PřF UK a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (MSMT-31114/2013-9).

3.2. Imunohistochemické experimenty

Imunohistochemie (IHC) byla použita pro detekci a lokalizaci vybraných cytokinů (viz dále) v míše myši infikovaných *T. regenti* (3, 7, 14, 21 dpi a zdravé myši jako kontroly). Myši byly nejprve perfundovány promývacím a fixačním roztokem, následně z nich byla izolována mícha, z níž byly zhotoveny kryorezy. Ty pak byly použity pro peroxidázové či imunofluorescenční značení cytokinů.

3.2.1. Transkardiální perfuze

Roztoky a chemikálie:

- Anestetikum: Připravené vždy čerstvé v pokojové teplotě v injekčních stříkačkách o objemu 1 ml.

Složení:

10% (v/v) Rometar (Bioveta), výsledná koncentrace xylazinu = 2 mg/ml

20% (v/v) Narketan (Vétoquinol), výsledná koncentrace ketaminu = 20 mg/ml

Sterilní fyziologický roztok (Mayerofer Pharmaceutica)

- Promývací roztok: Heparinizovaný (10 U/ml, Zentiva) fosfátový pufr (PBS¹) o teplotě 37 °C
- Fixační roztok: 4% (m/v) formaldehyd v PBS čerstvě připravený rozpouštěním paraformaldehydu (Sigma Aldrich) ve vodní lázni při 72 °C a ochlazený na ledu.

Postup:

Myš byla hluboce uspána intraperitoneálně podaným anestetikem o objemu 250–300 µl (v závislosti na hmotnosti myši) a zafixována k pitevní podložce. Po otevření hrudního koše byla do levé srdeční komory opatrně zavedena 25G jehla perfuzní soustavy a nastřížena pravá srdeční předsíň. Injekční stříkačkou byl pomalu vtlačen promývací roztok (cca 30–40 ml). Úspěšné vykrvení se projevilo odbarvením jater. Poté byla myš perfundována stejným objemem fixačního roztoku.

3.2.2. Zpracování tkáně pro kryorezy a jejich zhotovení

Po perfuzi byla vyjmuta páteř, zbavena co největšího množství svaloviny a postfixována 15 min ve fixačním roztoku. Poté byla vypreparována mícha včetně zbylých částí

¹ PBS (0,1M) byl ve všech experimentech připravován z 10x konc. zásobního sterilního roztoku (složení: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,53 g Na₂HPO₄·12H₂O; 0,2 g KH₂PO₄ a doplněno na 1000 ml H₂O; pH = 7,4)

odstupujících nervů a rozdělena do následujících segmentů: krční část (končící na rozhraní 7. krčního a 1. hrudního obratle), hrudní část (končící mezi 10. a 11. hrudním obratlem), bederní část (končící mezi 1. a 2. bederním obratlem) a ocasní část (kaudálně od druhého bederního obratle). Každý z jednotlivých segmentů byl umístěn do 2 ml 4% formaldehydu a postfixován ve 4 °C přes noc.

Z nafixované tkáně byla vymyta fixáž (3x15 min v PBS) a tkáň byla ve 4 °C prosycena kryoprotektantem (sacharóza (Pentax) v PBS): 2 h 10% sacharóza, 6 h 20% sacharóza, přes noc (příp. do doby, než tkáň klesla na dno zkumavky) 30% sacharóza. Poté byla tkáň přenesena do zamrazovacího média (Tissue Freezing Medium, Leica Biosystems) a v zamrazovacích formičkách (Leica Biosystems) uložena do -20 °C (přes noc), příp. pro delší uchování přesunuta do -80 °C.

Hluboce zamražené bločky tkáně byly krájeny na kryomikrotomu (Leica Biosystems CM3050S) s komorou a držákem vychlazenými na -20 °C. Podélné řezy tkání silné 10 µm byly přeneseny na vysoce adhezivní podložní skla X-tra (Leica Biosystems) a pod světelným mikroskopem byla ihned zkontrolována přítomnost schistosomul v tkáni. Sklíčka s pozitivními řezy určená pro IHC značení byla uchovávána v -80 °C maximálně po dobu 4 měsíců.

3.2.3. Peroxidázové IHC značení

Pro IHC detekci cytokinů bylo nejprve testováno chromogenní značení s využitím sekundárních protilátek konjugovaných s křenovou peroxidázou. Nervová tkáň ovšem vykazovala vysokou aktivitu endogenní peroxidázy, která reagovala s chromogenem (3,3'-diaminobenzidin) a způsobovala falešně pozitivní výsledky. V rámci předpokusů bylo zjištěno, že aktivitu endogenní peroxidázy ve tkáni blokuje inkubace řezů v 0,3% H₂O₂ v metanolu po dobu 45 minut v pokojové teplotě. To bylo vyhodnoceno jako podmínky pravděpodobně nevhodné pro zachování epitopů pro vazbu protilátek, což bylo potvrzeno neúspěšnou detekcí IL-6 podle protokolu uvedeného níže (kapitola 3.2.4.) s použitím sekundární protilátky Peroxidase AffiniPure Goat anti Rat (Jackson ImmunoResearch, 1:1000). Proto bylo od této metody upuštěno a byla nahrazena IHC s fluorescenčním značením.

3.2.4. Imunofluorescenční IHC značení

Na kryosezech bylo provedeno dvojité imunofluorescenční značení vybraných cytokinů a astrocytů či mikroglie. Jako marker astrocytů byl vybrán kyselý gliový fibrilární protein (GFAP, z angl. glial fibrillary acidic protein), mikroglie byly značeny lektinem *Ricinus communis* aglutinin I (RCA I; Kettenmann & Ransom, 2013, s. 90; Krčmářová, 2017)

Roztoky a chemikálie:

- PBS
- Blokační/inkubační pufr: 1% hovězí sérový albumin (BSA, z angl. bovine serum albumin) (Sigma Aldrich), 0,1% Triton-X-100 (Sigma Aldrich) v PBS

Postup:

Vytemperované kryosezy byly orámované hydrofobní tužkou NovoPen (Leica Biosystems), umístěny do vlhké komůrky a rehydratovány/promyty 6x5 min PBS. Poté byly 60 min blokovány blokačním pufrem kvůli zamezení nespecifických vazeb. Navázání primárních protilátek (viz Tab. 1) probíhalo přes noc ve vlhké komůrce ve 4 °C v inkubačním pufru. V případě kontroly nespecifické vazby sekundární protilátky byly vzorky inkubovány pouze v inkubačním pufru. Druhý den byly nenavázané primární protilátky vymyty 6x5 min PBS. Od této fáze probíhala práce s omezeným přístupem světla. Řezy byly inkubovány se sekundárními protilátkami, popř. lektiny (viz Tab. 1) v inkubačním pufru 90 min ve tmě v pokojové teplotě. Nenavázané reagentie byly vymyty 6x5 min PBS a poté byly řezy montovány do média VectaShield s 4',6-diamidin-2-fenyloindolem (DAPI) (Vector Laboratories) pro označení buněčných jader. Kontrola specifity vazby polyklonálních primárních protilátek získaných z králíka (pro IL-1 β , IL-17 a astrocyty při použití GFAP (Dako)) byla provedena jejich nahrazením v pracovním postupu sérem ze zdravého králíka (Dako) při stejné koncentraci jako příslušná primární protilátka. Vzorky byly prohlíženy ve fluorescenčním mikroskopu (Olympus BX51), fotografovány (Olympus DP-2) a výsledné fotografie zpracovány v programech Quick PHOTO MICRO 3.0 a GIMP 2.8.

Tab. 1: Kombinace protilátek a lektinu pro IHC a jejich koncentrace

	Detekce cytokinů		Detekce astrocytů/mikroglíí	
	Primární protilátka; ředění	Sekundární protilátka; ředění	Primární protilátka/lektin ² ; ředění	Sekundární protilátka; ředění
IL-1β	Polyclonal rabbit anti-mouse IL-1β (Acris antibodies); 1:200	Goat anti-rabbit Alexa Fluor® 568 (Invitrogene); 1:1000	Monoclonal mouse anti-GFAP (Cell signaling technology); 1:600	Donkey anti-mouse Alexa Fluor® 488 (Invitrogen); 1:1000
			Lektin RCA I konjugovaný s fluoresceinem (Vector laboratories); 1:750	X
IL-4	Monoclonal rat anti-mouse IL-4 (Abcam); 1:40	Goat anti-rat Alexa Fluor® 568 (Invitrogene); 1:1000	Polyclonal rabbit anti-GFAP (Dako); 1:1000	Goat anti-rabbit Alexa Fluor® 488 (Invitrogen); 1:1000
			Lektin RCA I konjugovaný s fluoresceinem (Vector laboratories); 1:750	X

² V případě vzorků 21 dpi se nepodařilo označit buňky lektinem RCA I. Přítomnost mikroglíí/makrofágů v buněčném infiltrátu byla potvrzena standardním protokolem s použitím primární protilátky proti mikroglíálnímu proteinu vázající vápník 1 (Iba-1, z angl. ionized calcium-binding adapter molecule 1) (Synaptic Systems; 1:1000) namísto protilátek uvedených v Tab. 1. Jako sekundární protilátka byla použita Goat anti-rabbit Alexa Fluor® 488 (Invitrogen); 1:1000.

Tab. 1: Kombinace protilátek a lektinu pro IHC a jejich koncentrace (pokračování)

	Detekce cytokinů		Detekce astrocytů/mikroglíí	
	Primární protilátka; ředění	Sekundární protilátka; ředění	Primární protilátka/lektin; ředění	Sekundární protilátka; ředění
IL-6	Monoclonal rat anti-mouse IL-6 (Acris antibodies); 1:200	Goat anti-rat Alexa Fluor® 568 (Invitrogene); 1:1000	Polyclonal rabbit anti-GFAP (Dako); 1:1000	Goat anti-rabbit Alexa Fluor® 488 (Invitrogen); 1:1000
			Lektin RCA I konjugovaný s fluoresceinem (Vector laboratories); 1:750	X
IL-17	Polyclonal rabbit anti-mouse IL-17 (Abcam); 1:200	Goat anti-rabbit Alexa Fluor® 568 (Invitrogene); 1:1000	Monoclonal mouse anti-GFAP (Cell signaling technology); 1:600	Donkey anti-mouse Alexa Fluor® 488 (Invitrogen); 1:1000
			Lektin RCA 1 konjugovaný s fluoresceinem (Vector laboratories); 1:750	X

3.2.5. Ověření přítomnosti schistosomul v míše

V případě dlouhodobých nálezů (14 a 21 dpi), kdy jsou schistosomula již často poškozená a degradovaná (Lichtenbergová et al. 2011), bylo obtížné jednoznačně určit, zda je objekt nalezený při inspekci kryořezů ve světelném mikroskopu skutečně schistosomulum. V takovém případě bylo provedeno kontrolní IHC ověření identity suspektního objektu.

Aplikován byl standardní IHC protokol popsáný výše s následujícími modifikacemi: (a) namísto primární protilátky bylo použito sérum myši 3–4x infikovaných *T. regenti* (ředění 1:150, doba inkubace 90 minut v pokojové teplotě; poskytl Mgr. Vladimír Šteiger z helmintologické laboratoře Katedry parazitologie PřF UK), (b) jako sekundární protilátka bylo použito Donkey anti-mouse Alexa Fluor[®] 488 (Invitrogen) nebo Goat anti-mouse Alexa Fluor[®] 568 (Invitrogen) (ředění 1:1000, doba inkubace 60 minut v pokojové teplotě). V případě pozitivní reakce byl suspektní objekt vyhodnocen jako schistosomulum a sousední kryorezy byly použity pro další značení.

3.3. Cytometrické experimenty

Průtoková cytometrie byla použita pro fenotypizaci T lymfocytů za účelem charakterizace polarizace imunitní odpovědi myši infikovaných *T. regenti*. Buňky byly izolovány ze sleziny infikovaných zvířat (3, 7, 14, 21 dpi), zdravé myši sloužily jako biologické negativní kontroly. Splenocyty byly následně stimulovány a na průtokovém cytometru byly posléze sledovány populace Th1, Th2, Th17 a Treg lymfocytů. Myši ze stejného intervalu infekce byly zpracovány vždy ve stejný den. S výjimkou krátkodobé stimulace bylo s buňkami manipulováno na ledu a byly používány vychlazené roztoky.

Roztoky a chemikálie:

- PBS
- Kultivační médium
 - RPMI 1640 s fenol červení (Lonza)
 - 10% (v/v) fetální hovězí sérum (Labtech)
 - 1% (v/v) L-glutamin (Lonza), výsledná koncentrace 2 mM
 - 1% (v/v) penicilin-streptomycin (Lonza), 100 U/ml, resp. 100 µg/ml
- Stimulační směs A
 - kultivační médium
 - brefeldin A (BFA) (eBioscience), výsledná koncentrace 10 µg/ml
 - ionomycin (Ca²⁺ sůl), původem ze *Streptomyces conglobatus* (≥98% HPLC) (Sigma Aldrich), výsledná koncentrace 1 µg/ml
 - phorbol 12-myristát 13-acetát (Sigma Aldrich), výsledná koncentrace 50 ng/ml
- Kontrolní směs A
 - kultivační médium

- BFA (eBioscience), výsledná koncentrace 10 µg/ml
- Stimulační směs B
 - kultivační médium
 - monensin (Mon) (Sigma Aldrich), výsledná koncentrace 5µM
 - ionomycin (Ca²⁺ sůl), původem ze *Streptomyces conglobatus* (Sigma Aldrich), výsledná koncentrace 1 µg/ml
 - phorbol 12-myristát 13-acetát (Sigma Aldrich), výsledná koncentrace 50 ng/ml
- Kontrolní směs B
 - kultivační médium
 - Mon (Sigma Aldrich), výsledná koncentrace 5µM

3.3.1. Získání splenocytů a jejich stimulace

Myš byla hluboce uspána ve sklenici s inhalačním anestetikem Isoflurin[®] (Vetpharma animal health) dle pokynů výrobce. Z břišní dutiny byla vystřižena slezina, jež byla rychle zvážena a vyfotografována s milimetrovým měřítkem pro následné měření velikosti v programu ImageJ 1.51j8. Slezina byla poté v Petriho misce s PBS na ledu mechanicky rozvolněna pomocí pinzet a následně v 1,5ml mikrozkušavce pomocí jednorázového plastového mikrohomogenizátoru. Buněčná suspenze byla přefiltrována přes sítko s velikostí pórů 70 µm (Greiner bio-one) do 50ml zkumavky, objem byl doplněn PBS na 25 ml a zkumavka byla centrifugována³ 2x5 min. Mezi jednotlivými centrifugacemi byl vždy odstraněn supernatant, resuspendován pelet a objem doplněn PBS na původní množství.

Následně byl pelet (získaný vždy z celé sleziny) za sterilních podmínek v laminárním boxu (Esco) resuspendován do kultivačního média a rozdělen do Petriho misek s příslušnými stimulačními nebo kontrolními směsmi (viz Tab. 2). Buňky byly kultivovány 4 hodiny v inkubátoru (Esco) při 37 °C a 5% CO₂.

Tab. 2: Rozdělení buněčné směsi do Petriho misek

Stimulační/kontrolní směs	Průměr Petriho misky	Objem směsi s buňkami
A	60 mm	3 ml
B	35 mm	1 ml

³ Centrifugace probíhala vždy při 350 g a 4 °C v centrifuze Heraeus Megafuge 8R.

3.3.2. Příprava vzorků pro průtokovou cytometrii

Směs z jednotlivých misek byla (po opláchnutí PBS) centrifugována v 5ml centrifugačních zkumavkách 10 minut. Pelet byl poté resuspendován do 1% BSA/PBS, objem doplněn na 5 ml a opět 2x5 min centrifugován. Po resuspendování do 1% BSA/PBS byla odebrána část buněk sloužící jako neznačený vzorek (blank) a do zbytku byla přidána protilátka proti CD16/32 (eBioscience, klon 93) v koncentraci 1:100 sloužící k zablokování případných nespecifických vazeb protilátek na Fc receptory buněk. Směs byla mírně promíchána a rozdělena po 20 µl/jamka na 96 jamkovou mikrotitrační destičku z polypropylenu s kulatým tvarem dna. Do každé jamky s buněčnou suspenzí bylo přidáno 20 µl 1% BSA/PBS s připravenou směsí protilátek proti povrchovým markerům a fluorochromu vázajícího se do mrtvých buněk (viz Tab. 3). Do neznačených vzorků byl přidán pouze 1% BSA/PBS.

Tab. 3: Reagencie pro značení povrchových markerů a mrtvých buněk

Specifita	Výrobce	Klon	Fluorochrom	Výsledná koncentrace
CD3	Biolegend	17A2	Brilliant Violet 421	1:150
CD4	Biolegend	GK1.5	FITC	1:150
CD25	eBioscience	PC61.5	PerCP-Cy5.5	1:80
Mrtvé buňky	Invitrogen	-	Ex/em: 367/526 nm	1:600

Po 30min inkubaci ve tmě při 4 °C bylo do každé jamky přidáno 100 µl PBS a destičky centrifugovány 5 min, pelet resuspendován do 200 µl PBS a destičky opět centrifugovány 5 min. Poté byl pelet resuspendován do 100 µl fixačního pufru (True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set, Biolegend)⁴, destičky přelepeny fólií proti vysychání a přes noc inkubovány ve 4 °C ve tmě. Druhý den bylo přidáno 100 µl permeabilizačního pufru s 1% BSA (True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set, Biolegend) a destičky centrifugovány 5 min. Následně bylo přidáno 200 µl 1%BSA v permeabilizačním pufru a centrifugováno 5 min. K peletu bylo přidáno 30 µl/jamka připravené směsi protilátek pro detekci cytokinů a transkripčních faktorů (TF) jednotlivých buněčných populací, případně izotypové kontroly (viz Tab. 4) v permeabilizačním pufru s 1% BSA. Inkubace probíhala 30 minut při 4 °C ve tmě. Izotypové kontroly byly z finančních důvodů a s ohledem na zvolený

⁴ Byl zvolený pufr pro detekci TF, jelikož i tak lze detekovat cytokiny, i když je možné, že s menší senzitivitou. V opačném případě (pufr pro cytokiny), by detekce TF nebyla možná.

fixační/permeabilizační pufr provedeny jen pro detekci TF. Po inkubaci bylo přidáno 100 μ l 1% BSA v permeabilizačním pufru a centrifugováno 5 min. Následovalo 2x promývání s 200 μ l 1% BSA v permeabilizačním pufru s centrifugací 5 min. Nakonec byl pelet resuspendován do 150 μ l samotného permeabilizačního pufru a vzorky měřeny na průtokovém cytometru.

Tab. 4: Použité protilátky proti intracelulárním markerům a izotypové kontroly

Detekovaná populace	Protilátky (klon, výrobce)	Izotypové kontroly	Koncentrace
Th1	PE anti-mouse IFN- γ (XMG1.2, Biolegend)	X	1:100
	APC anti-T-bet (4B10, Biolegend)	APC Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody (Biolegend)	1:70
Th2	APC anti-mouse IL-4 (11B11, Biolegend)	X	1:80
	Gata-3 Monoclonal antibody, PE (TWAJ, eBioscience)	Rat IgG2b kappa Isotype Control, PE (eBioscience)	1:100
Th17	APC anti-mouse IL-17A (TC11-18H10.1, Biolegend)	X	1:70
	ROR γ (t) Monoclonal Antibody, PE (AFKJS-9, eBioscience)	Rat IgG2a κ Isotype Control, PE (eBioscience)	1:80
Treg	IL-10 Monoclonal Antibody (JES5-16E3), APC (eBioscience)	X	1:80
	Foxp3 Monoclonal Antibody (FJK-16S), PE (eBioscience)	Rat IgG2a κ Isotype Control, PE (eBioscience)	1:100

3.3.3. Měření na průtokovém cytometru

Měření probíhalo z mikrotitračních destiček na přístroji BD LSR II v servisní Laboratoři cytometrie PřF UK s využitím programu FACSDiva (BD Biosciences). Správná kalibrace přístroje byla zajištěna každodenním nastavením aktuálních „application settings“ a

zkontrolována před každým měřením pomocí kitu Rainbow calibration particles (Spherotech). Před prvním měřením vzorků byla vypočítána kompenzační matrix na základě měření vzorků připravených dle výše uvedeného protokolu se stimulační směsí A, ale značených jen jednou protilátkou s využitím všech používaných fluorochromů (viz Tab. 5). Část protilátek pro tento účel laskavě poskytla RNDr. Michaela Hájková, Ph.D. (Katedra buněčné biologie PřF UK). Kompenzační matrix byla vypočítána automaticky programem FACSDiva, manuálně upravena za asistence MVDr. Jozefa Jandy, PhD. (Laboratoř cytometrie PřF UK) a následně aplikována pro všechna měření. Analýza dat byla provedena v programu FlowJo 10.4.2 (FlowJo).

Tab. 5: Protilátky použité pro výpočet kompenzační matrix

Specifita	Výrobce	Klon	Fluorochrom	Koncentrace
CD3	Biolegend	17A2	Brilliant Violet 421	1:100
CD4	Biolegend	GK1.5	FITC	1:100
CD4	BD Bioscience	L3T4	PE	1:100
CD4	Biolegend	GK1.5	APC	1:100
CD25	eBioscience	PC61.5	PerCP-Cy5.5	1:100
Mrtvé buňky	Invitrogen	-	Ex/em: 367/526 nm	1:600

3.4. Statistika

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programu GraphPad Prism (verze 6). Pro porovnání více skupin byl použit Kruskalův-Wallisův test následovaný Dunnovým testem pro mnohočetné srovnání s kontrolní (nenakaženou) skupinou. Závislost dvou proměnných byla zhodnocena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Za statisticky signifikantní byl výsledek testu považován při $p < 0,05$ (použité značení: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). V grafech jsou dále uvedeny i nesignifikantní p-hodnoty, pokud byly v intervalu 0,05–0,20. Není-li uvedeno jinak, jsou data v grafech prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka.

4. Výsledky

4.1. IHC experimenty

Buněčná imunitní odpověď v okolí parazita migrujícího myši míchou byla charakterizována IHC průkazem cytokinů (prozánětlivých IL-1 β , IL-6 a IL-17 a protizánětlivého IL-4; vytipovány na základě literatury) a doplněna detekcí imunokompetentních gliových buněk (astrocyty a mikroglie). Ve výsledcích jsou prezentovány vybrané reprezentativní snímky z IHC s dvojitým imunofluorescenčním značením.

Pro optimalizaci IHC protokolu byl využit materiál z 15 nakažených myší, což významně překročilo původní předpoklad. Proto byl v rámci snížení počtu dále využitých experimentálních zvířat (s ohledem na limity stanovené platným projektem pokusu) experiment vícekrát zopakován jen pro interval 7 dpi. V době infekcí myší byla navíc oproti předchozím zkušenostem naší laboratoře snížena virulence používaného kmene *T. regenti*, což se projevilo nižšími počty schistosomul migrujících CNS, a tedy i snížením počtu použitelných kryořezů. Celkové množství schistosomul nalezených v jednotlivých míšních segmentech je shrnuto v Tab. 6 a jejich lokalizace v Tab. 7; bílá a šedá míšní hmota byly rozlišeny na základě rozdílné morfologie astrocytů (viz přílohy: Obr.p1). V Tab. 7 je uveden nižší počet myší i schistosomul, jelikož ne vždy bylo možné bezpečně určit přesnou lokalizaci schistosomula.

Tab. 6: Počet schistosomul nalezených v jednotlivých míšních segmentech myší, z nichž jsou prezentovány výsledky.

dpi	krční část	hrudní část	bederní část	ocasní část	počet myší
3	1	-	3	-	1
7	4	7	8	2	5
14	2	-	1	-	2
21	-	3	1	-	1

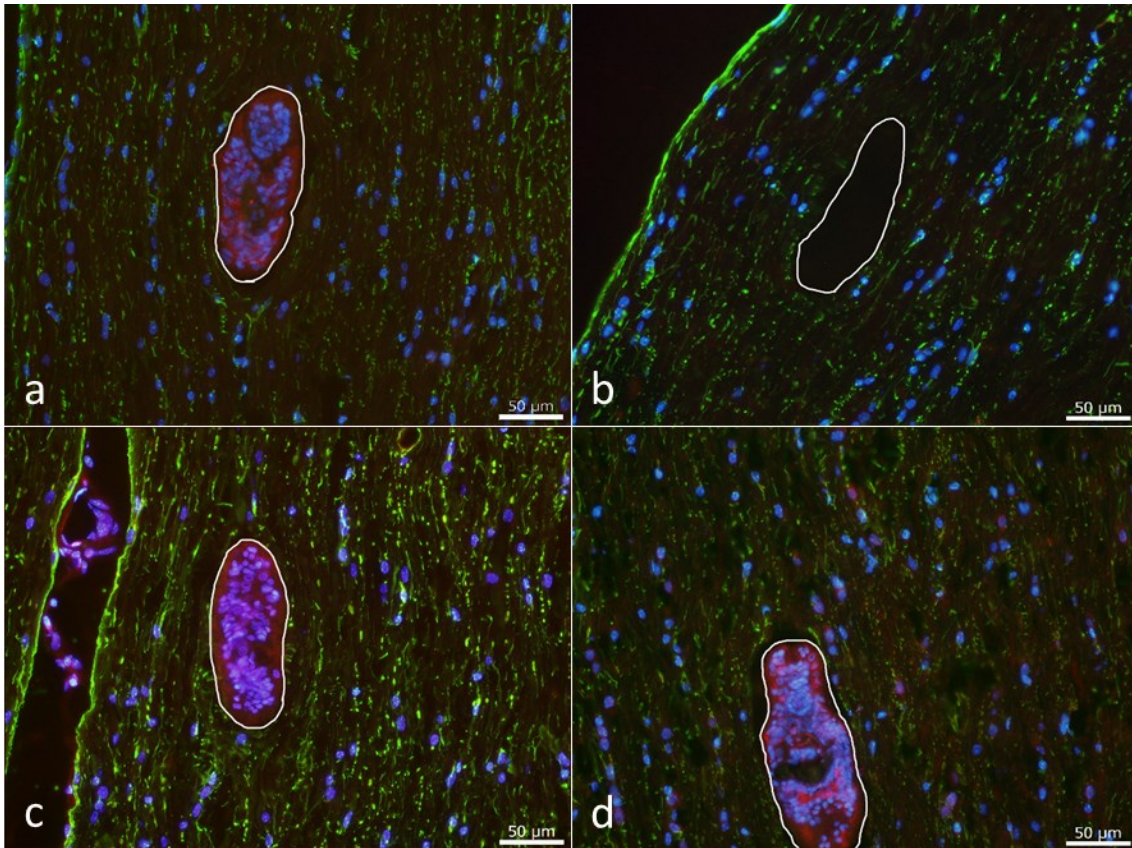
Tab. 7: Lokalizace schistosomul v míše nakažených myší.

submeningeální (sm); bílá hmota (wm, z angl. white matter); šedá hmota (gm, z angl. grey matter); centrální kanál (ck); rozhraní bílé a šedé hmoty (wm/gm)

dpi	sm	wm	wm/gm	gm	ck	počet myší
3	-	4	-	-	-	1
7	2	8	1	1	-	3
14	-	1	-	-	1	1
21	1	3	-	-	-	1

4.1.1. Cytokiny 3 dpi

Detekce každého z cytokinů byla provedena vždy alespoň na dvou různých řezech, vždy v kombinaci s astrocyty nebo mikroglie. Na žádném z řezů nebyla pozorována hypertrofizace astrocytů ani přítomnost RCA I pozitivních buněk. Stejně tak nebyl detekován IL-4 ani IL-6. U IL-17 byl zaznamenán slabý, patrně nespecifický signál v celé ploše bílé hmoty podobně jako u zdravé myši (Obr. 1). Ve všech případech docházelo k vazbě protilátek proti cytokinům do schistosomula. Pro vyloučení možnosti nespecifické vazby polyklonálních králičích protilátek do nervové tkáně myši (ať už v tomto či jiném intervalu), a tedy vzniku falešně pozitivních výsledků, byly řezy inkubovány se sérem zdravého králíka. I v tomto případě byla pozorována vazba králičích sérových protilátek do schistosomula, ale ne do myší tkáně (viz přílohy: Obr. p2). Protilátky získané z potkanů byly monoklonální, a tak byla jejich nespecifická vazba do myší tkáně nepravděpodobná a nebyla s ohledem na aktuální nedostupnost jistě negativního potkaního séra a také za účelem ušetření kryožezů se schistosomuly testována.

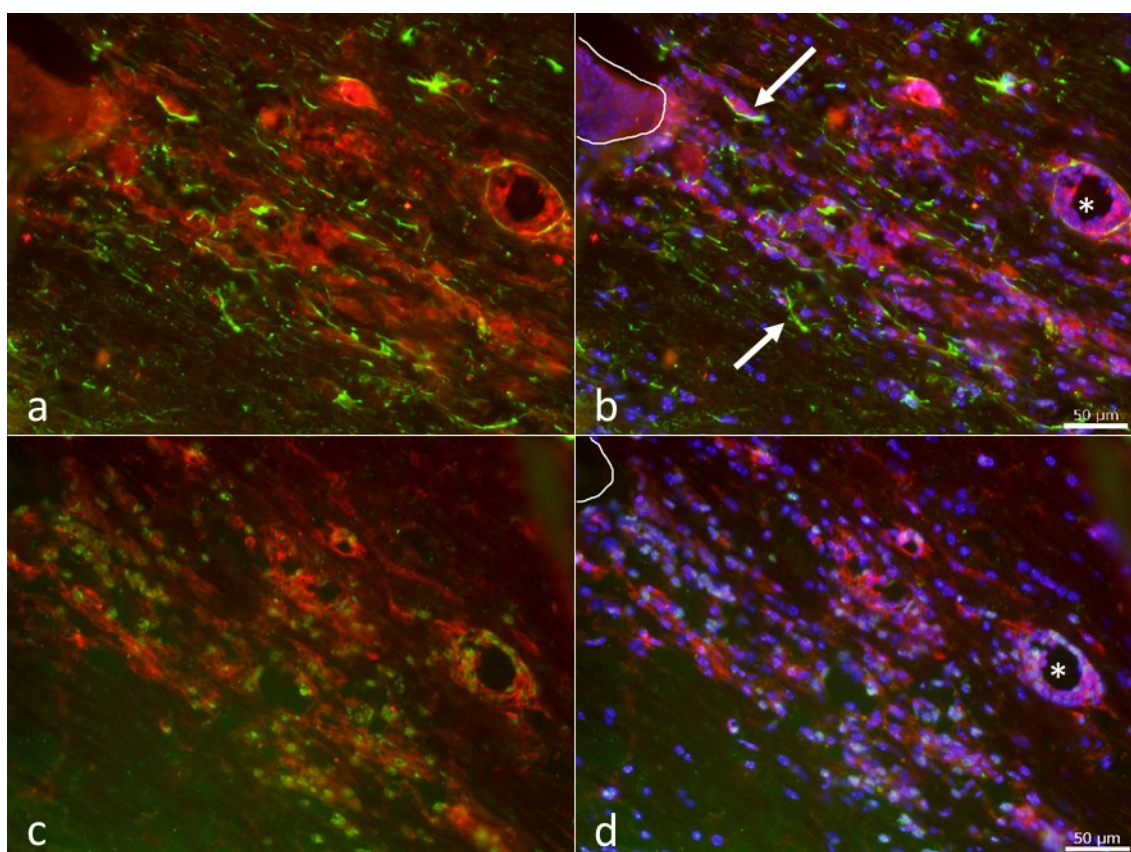


Obr. 1: Schistosomula v bílé hmotě 3 dpi, detekce vybraných cytokinů a gliových buněk; **a** – IL-1 β ; **b** – IL-4; **c** – IL-6; **d** – IL-17;
Cytokiny; astrocyty (**GFAP**); jádra (**DAPI**); prostor kde se nachází schistosomulum bíle orámováno

4.1.2. Cytokiny 7 dpi

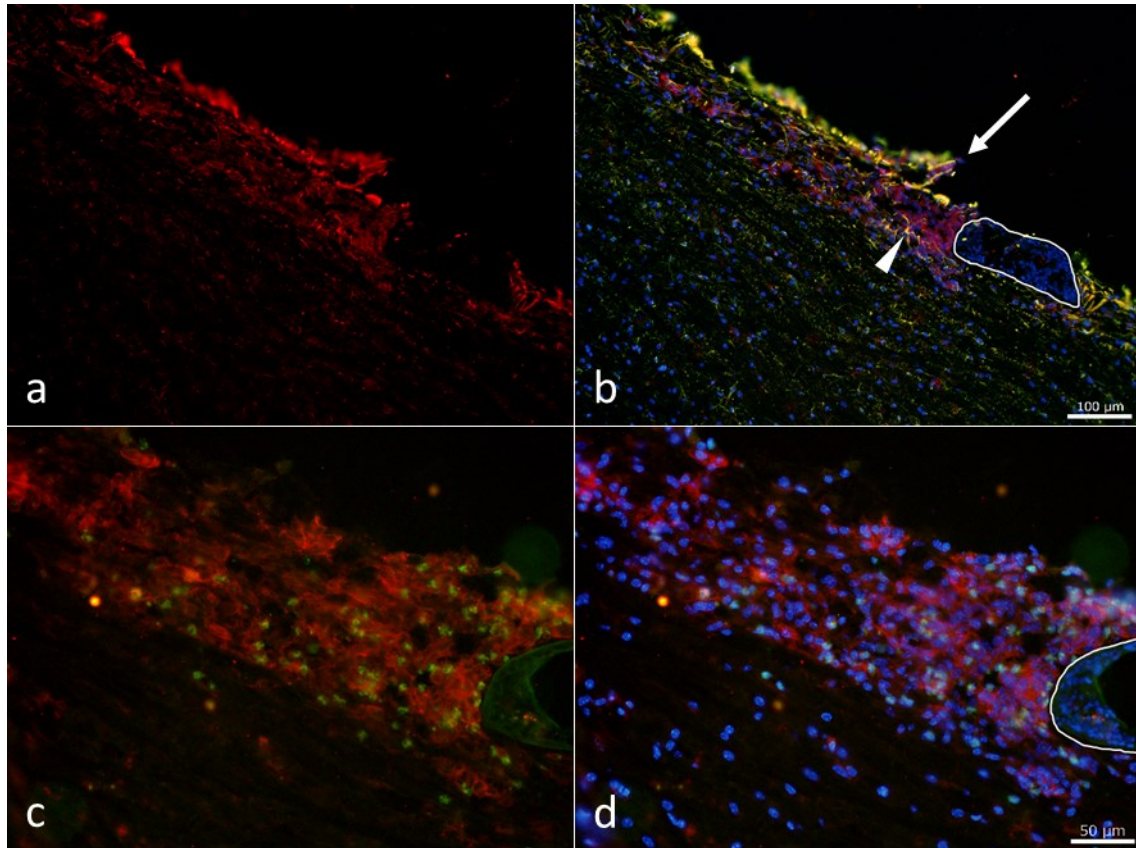
Pro vyhodnocení tohoto intervalu byly pro každý cytokin použity minimálně 2 řezy se schistosomulem ze 3 různých myší. Okolo parazita a v místech, kudy pravděpodobně migroval, se nacházely RCA I pozitivní buňky a astrocyty s prodlouženými buněčnými výběžky.

IL-4 byl pozorován okolo schistosomula migrujícího bílou hmotou míchy a zejména v migračním kanálu za ním (Obr. 2). V případě migrace submeningeálním prostorem byl IL-4 detekován pouze v migračním kanálu (Obr. 3), nicméně vyhodnocení těchto výsledku v některých případech komplikovala vazba protilátek do míšních meningů a jejich mechanické rozrušení. Distribuce signálu naznačovala produkci tohoto cytokinu částečně RCA I pozitivními buňkami, ale i hypertrofovanými astrocyty (Obr. 3) a dalšími (blíže necharakterizovanými) buněčnými typy.



Obr. 2: Schistosomulum v bílé hmotě 7 dpi, detekce vybraných cytokinů a gliových buněk. V migračním kanálu parazita se nacházejí hypertrofované astrocyty, IL-4 je zčásti produkován RCA I pozitivními buňkami.

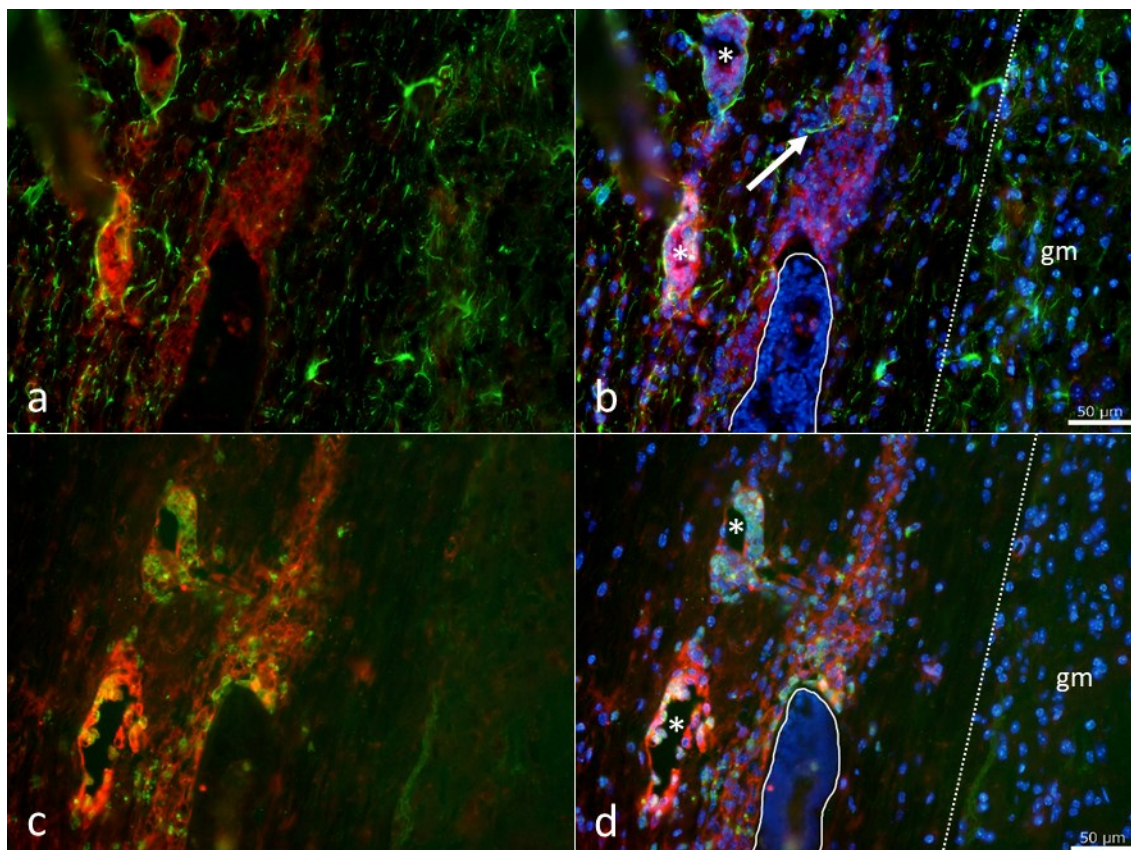
Cytokín (**IL-4**); jádra (**DAPI**); schistosomulum bíle orámováno; **a, b** – astrocyty (**GFAP**); šipka – hypertrofované astrocyty; hvězdička – céva ohraničená výběžky astrocytů; **c, d** – **RCA I** pozitivní buňky; hvězdička – céva



Obr. 3: Schistosomulum v submeningeálním prostoru s porušenými meningy a *glia limitans* 7 dpi, detekce vybraných cytokinů a gliových buněk. V migračním kanálu za schistosomulem dochází k akumulaci buněk produkujících IL-4.

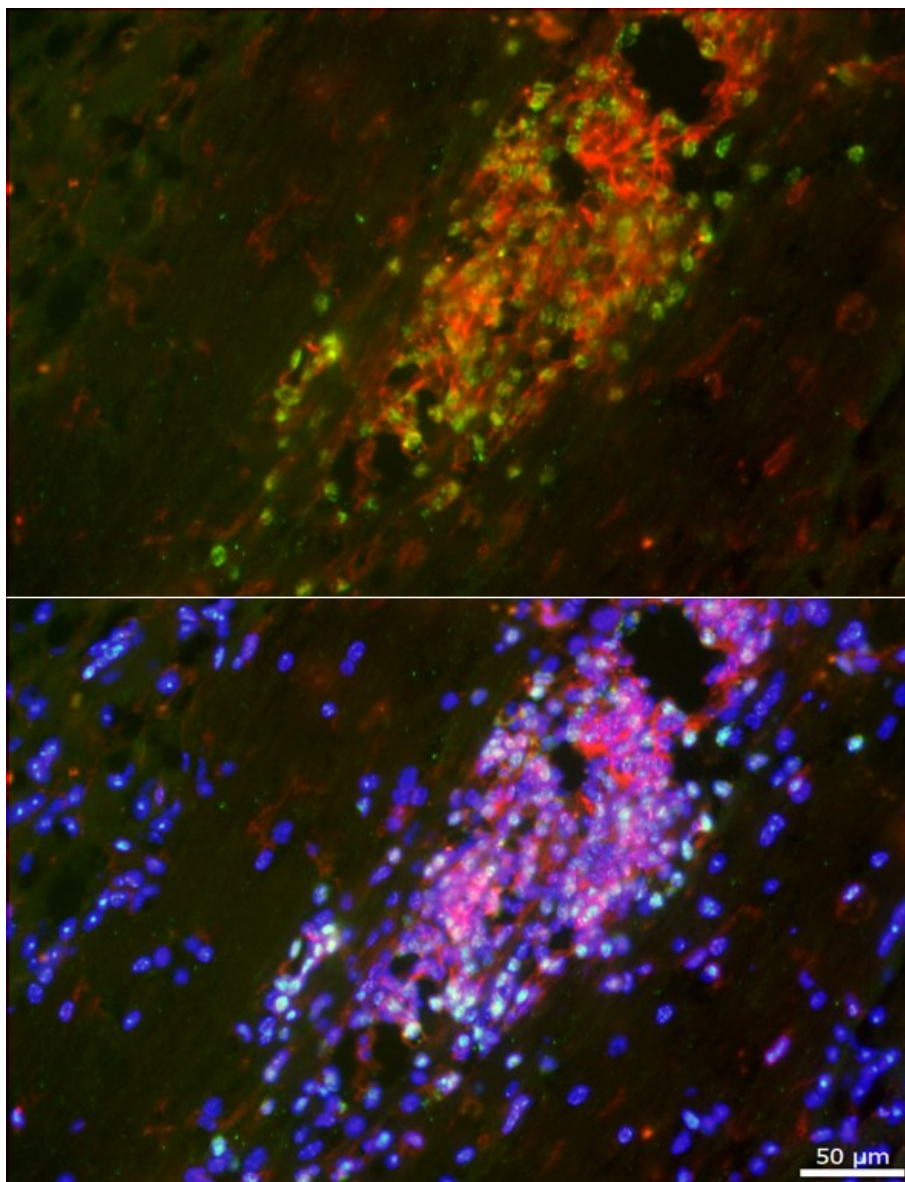
Cytokin (**IL-4**); jádra (**DAPI**); schistosomulum bíle orámováno; **b** – astrocyty (**GFAP**); šipka — porušené meningy/*glia limitans*; trojúhelník — hypertrofovaný astrocyt pozitivní i pro IL-4 (dvojitě pozitivní, a proto žlutě zbarvený); **c, d** – **RCA I** pozitivní buňky; (pozn. nespecifická vazba protilátek do meningů)

IL-6 byl pozorován v bílé hmotě za migrujícím parazitem a v jeho okolí za přítomnosti RCA I pozitivních buněk a hypertrofovaných astrocytů podobně jako v případě IL-4 (Obr. 4 a 5). Migrace schistosomula v submeningálním prostoru v tomto případě nevedla k narušení *glia limitans*, a proto lze s jistotou odlišit specifickou vazbu protilátky na IL-6 a nespecifickou vazbu na míšní meningy (Obr. 6).

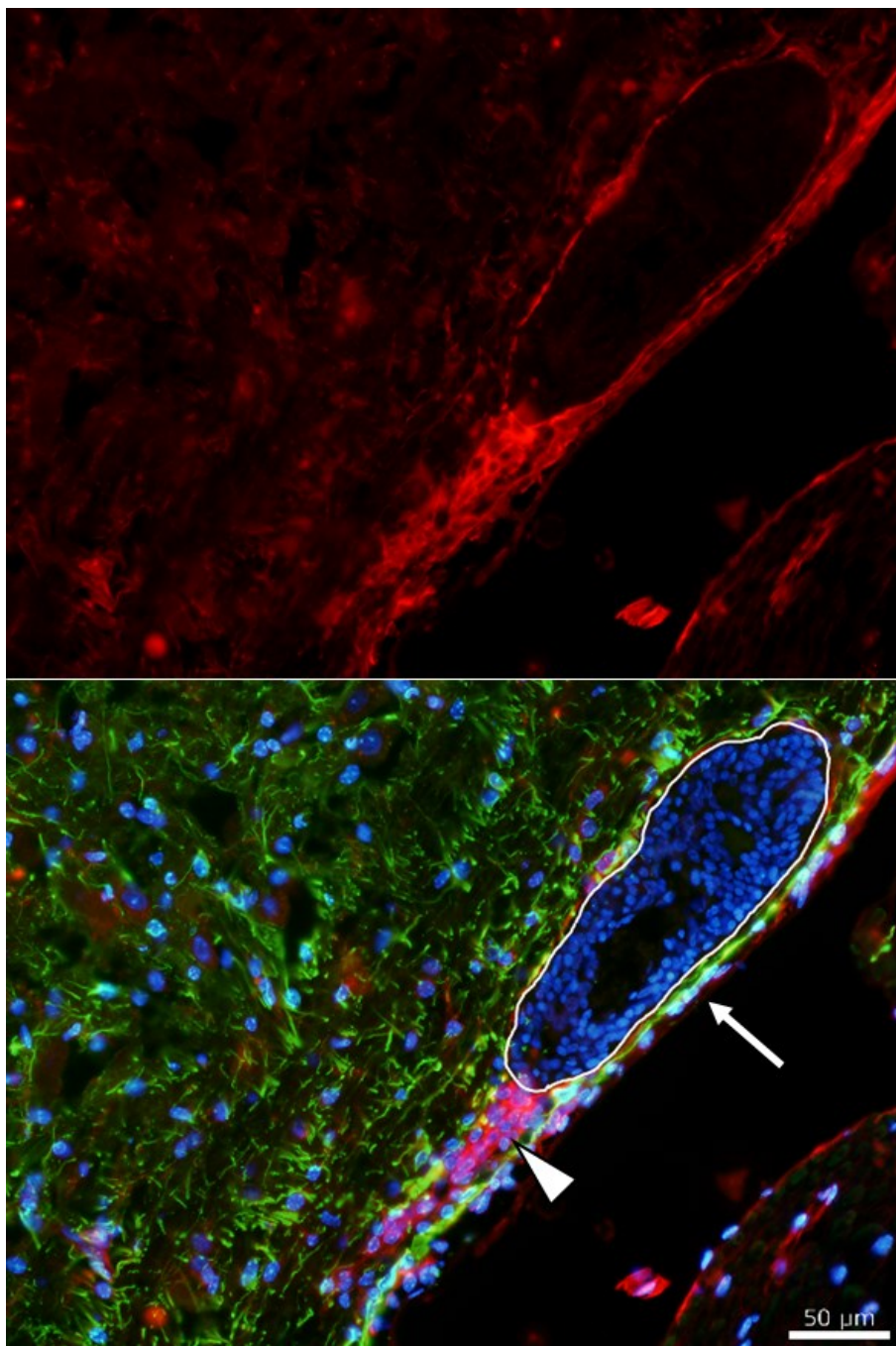


Obr. 4: Přítomnost IL-6 okolo schistosomula v bílé hmotě 7 dpi, detekce vybraných cytokinů a gliových buněk.

Cytokin (**IL-6**); jádra (**DAPI**); schistosomulum bíle orámováno; gm – šedá hmota (hranice wm/gm vyznačena tečkovanou čarou); hvězdička – cévy **a, b** – astrocyty (**GFAP**); šipka – hypertrofované astrocyty; **c, d** – **RCA I** pozitivní buňky



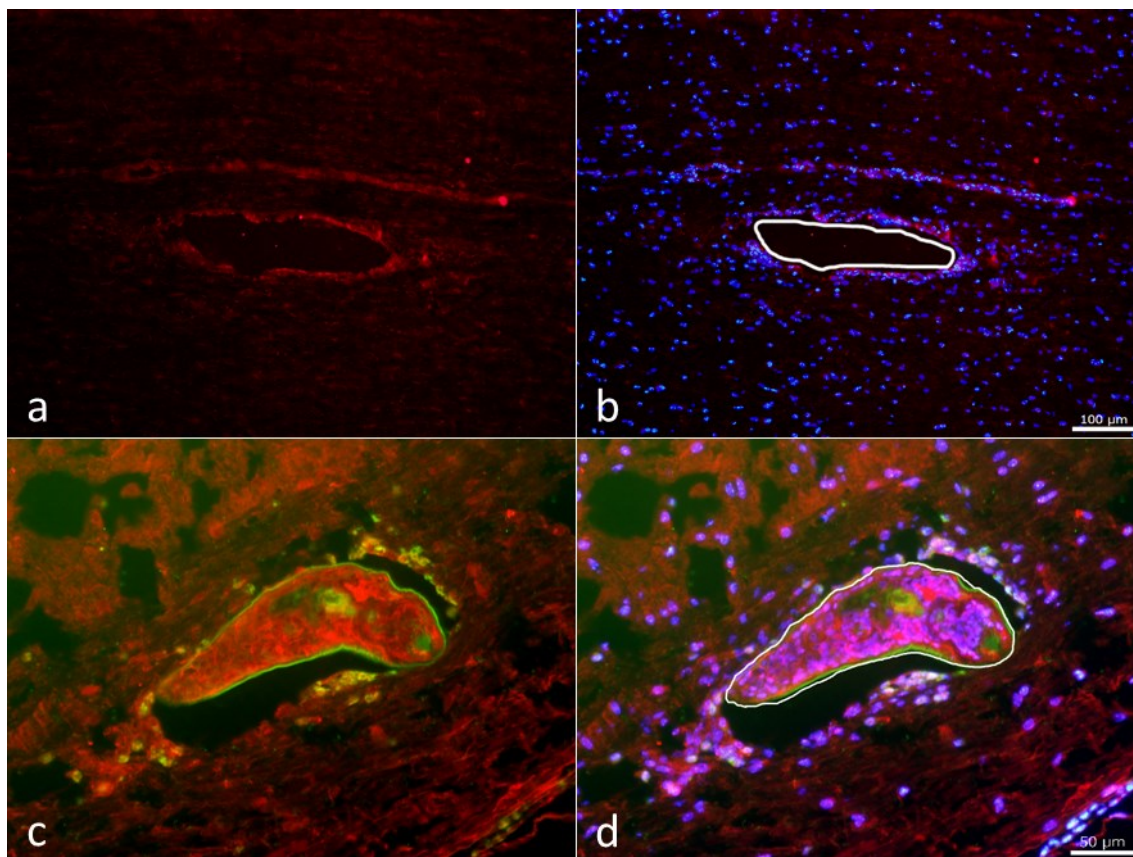
Obr. 5: Pás mikroglíí (RCA I pozitivních buněk) a jejich kolokalizace s IL-6 v bílé hmotě v místě, kudy migrovalo schistosomulum, 7 dpi.
Cytokin (**IL-6**); **RCA I** pozitivní buňky; jádra (**DAPI**)



Obr. 6: IL-6 v migračním kanálu za schistosomulem v submeningeálním prostoru, k porušení *glia limitans* nedochází.

Cytokin (**IL-6**); astrocyty (**GFAP**); jádra (**DAPI**); schistosomulum bíle orámováno; šipka — *glia limitans*; trojúhelník — buňky produkující IL-6; (pozn. nespecifická vazba protilátek do meningů)

IL-17 byl pozorován jen v těsném kontaktu se schistosomulem. V některých případech nebylo možné signál odlišit od pozadí zejména v šedé hmotě míchy (Obr. 7). K produkci IL-1 β nedocházelo stejně jako v případě intervalu 3 dpi.

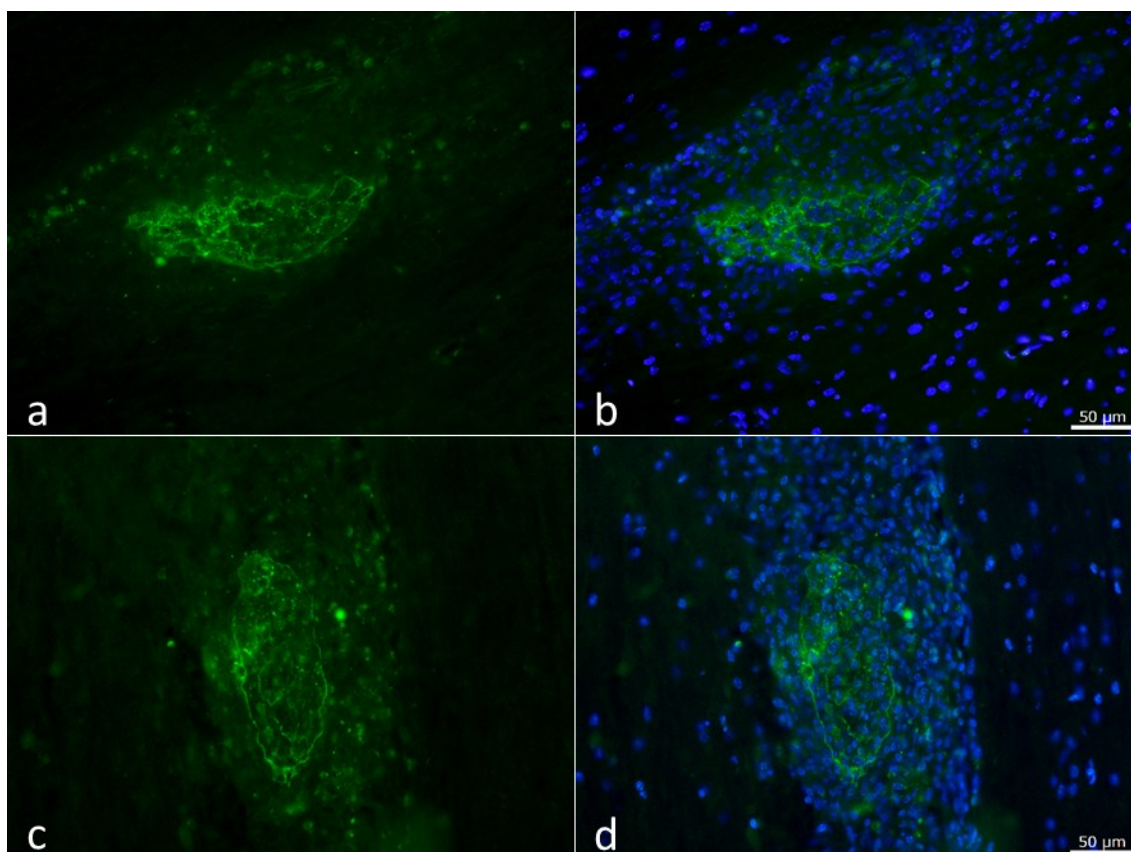


Obr. 7: Přítomnost IL-17 jen v těsném okolí schistosomul společně s RCA I pozitivními a dalšími blíže neurčenými buňkami. Na obrázcích a,b nejsou značeny gliové buňky. V některých případech je červený signál srovnatelný s výrazným pozadím (c,d), a tak ho nelze považovat za prokazatelně pozitivní.

Cytokin (IL-17); jádra (DAPI); RCA I pozitivní buňky; prostor, kde se nachází schistosomulum, bíle orámován

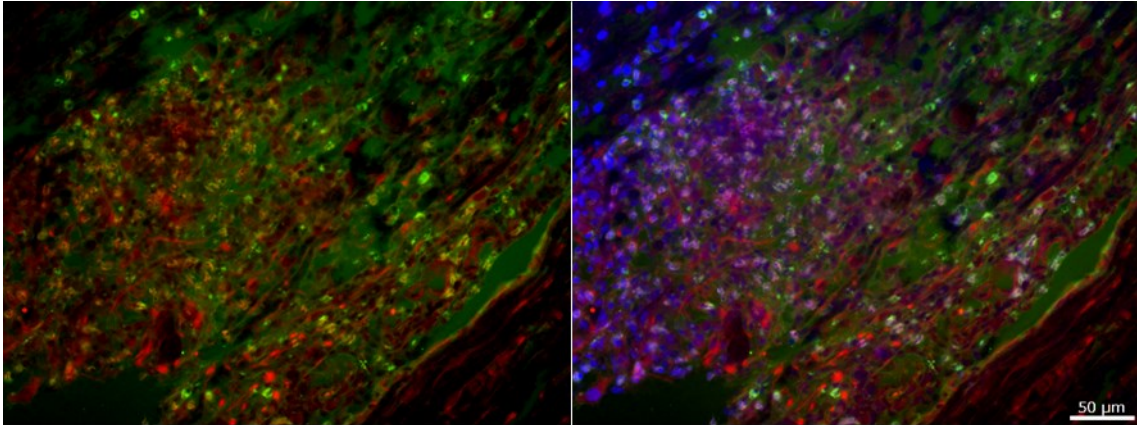
4.1.4. Cytokiny 14 dpi

Vzhledem k tomu, že 14 a 21 dpi již byla většina schistosomul v rozkladu a obklopena buňkami hostitele, tak bylo těžké je bezpečně rozeznat ve světelném mikroskopu. Pro potvrzení identity suspektních objektů bylo provedeno imunofluorescenční značení s využitím séra z myší reinfikovaných *T. regenti* (Obr. 8).



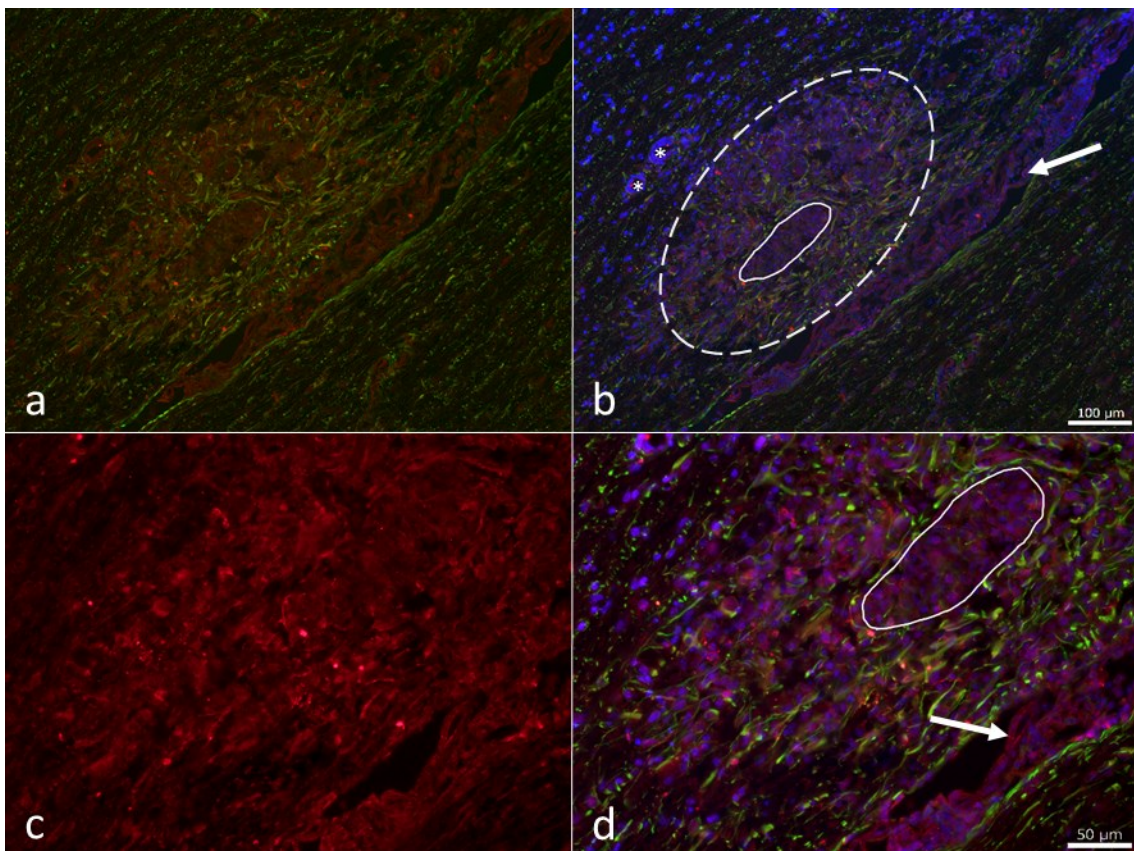
Obr. 8: Ověření identity schistosomul pomocí séra z reinfikovaných myší.
a, b — 14 dpi; c, d — 21 dpi; **Schistosomulum**; jádra (**DAPI**)

V rámci časového intervalu 14 dpi byly podobně jako v případě 3 dpi využity 2 různé řezy pro detekci každého cytokinu. Buňky akumulované v okolí schistosomula byly potvrzeny jako hypertrofované astrocyty a také RCA I pozitivní buňky. Lokalizace těchto buněk se shodovala se signálem IL-1 β , který byl pozorován poprvé právě v tomto intervalu (Obr. 9). Podobné výsledky byly zaznamenány i pro IL-17 (Obr. 10).



Obr. 9: IL-1 β a RCA I pozitivní buňky v místě degradujícího schistosomula v bílé hmotě 14 dpi.

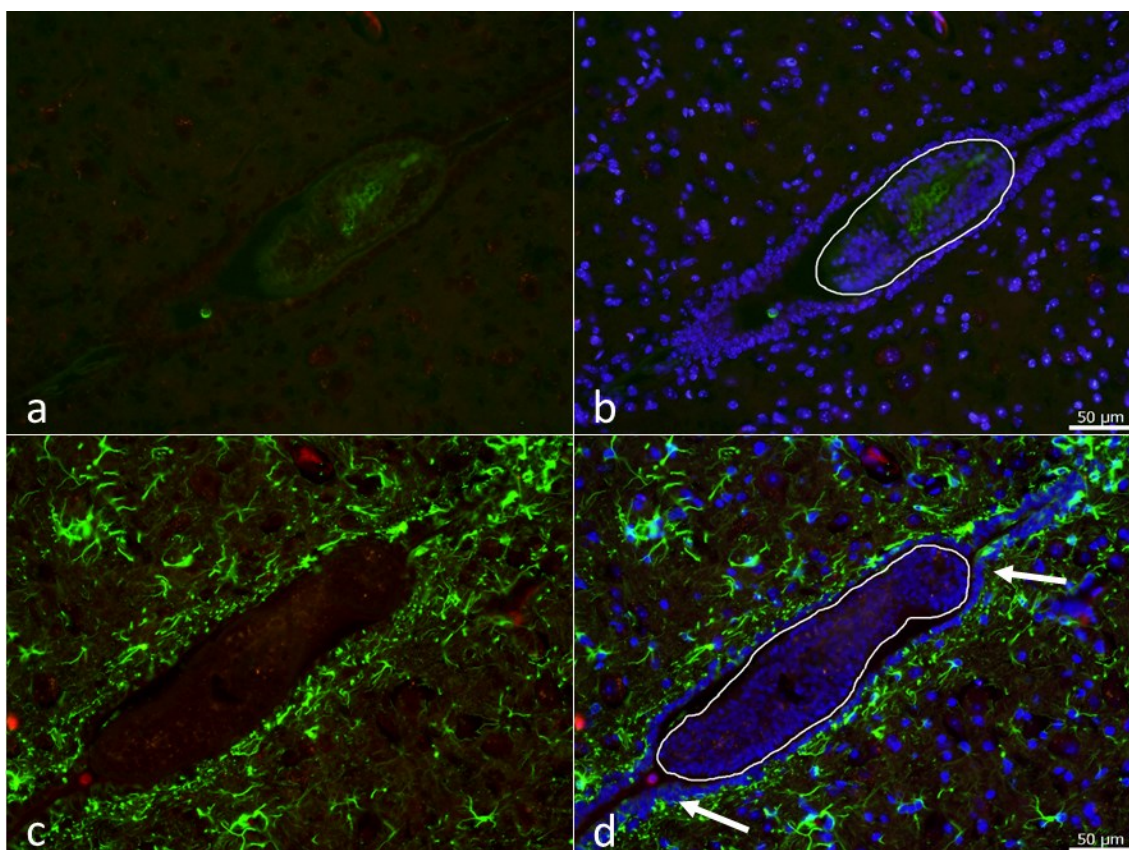
Cytokin (IL-1 β); jádra (DAPI); RCA I pozitivní buňky; (pozn. zelené pozadí je nespecifické)



Obr. 10: Hypertrofované astrocyty v bílé hmotě a IL-17 v okolí degradujícího schistosomula v bílé hmotě 14 dpi.

Cytokin (IL-17); a, b, d — astrocyty (GFAP); jádra (DAPI); degradující schistosomulum bíle orámováno plnou čarou; oblast ohraničená přerušovanou čarou — hypertrofované astrocyty; šipka — mediální rýha s nespecificky označenými meningy; hvězdičky — cévy

Jedno ze schistosomul v míše 14 dpi bylo nalezeno v centrálním kanálu krční části míchy. V jeho okolí nebyla na rozdíl od bílé hmoty pozorována žádná akumulace buněk, jen došlo k rozšíření centrálního kanálu. Také schistosomulum vypadalo neporušeně. V jeho okolí nebyly pozorovány žádné RCA I pozitivní buňky, hypertrofované astrocyty ani cytokiny IL-4 a IL-6 (Obr. 11).

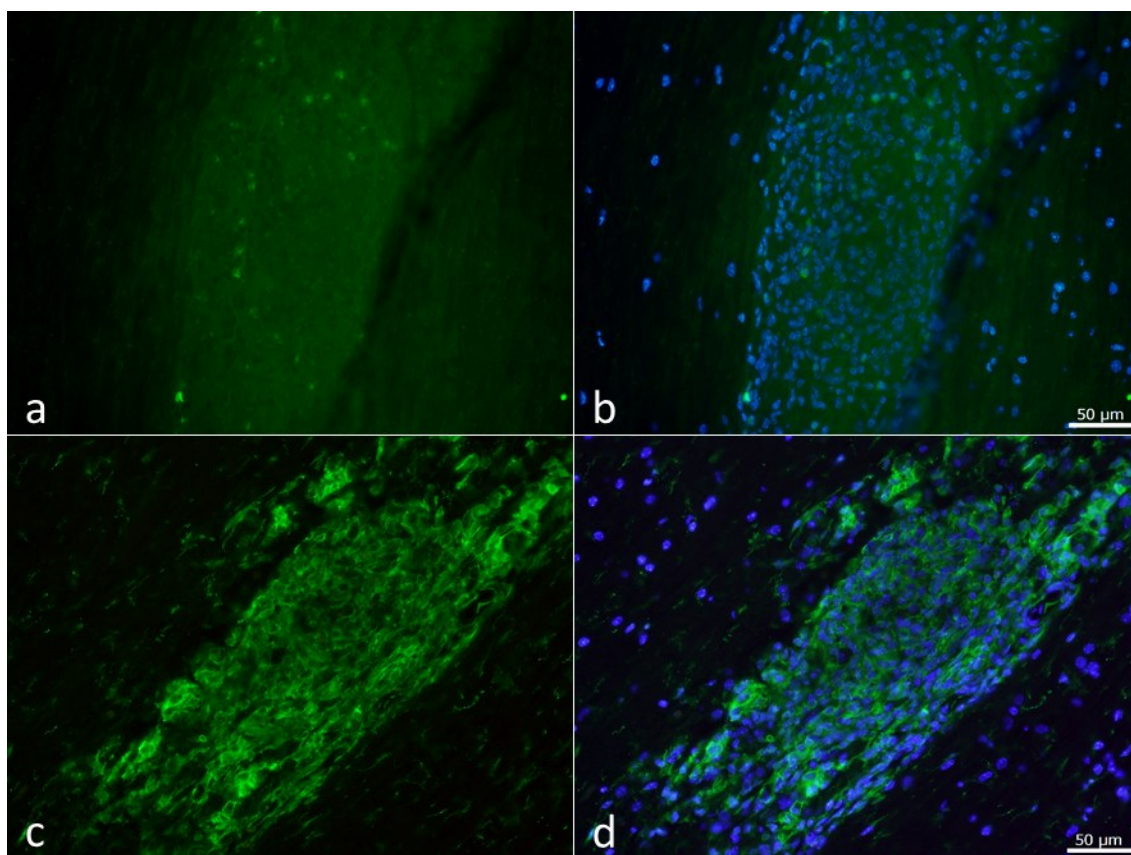


Obr. 11: Schistosomulum v centrálním kanálu 14 dpi, detekce vybraných cytokinů a gliových buněk. V okolí se nevyskytuje zřetelná buněčná imunitní odpověď. schistosomulum bíle orámováno; jádra (DAPI); a, b — cytokin (IL-4); RCA I pozitivní buňky; c, d — cytokin (IL-6); astrocyty (GFAP) šipky — rozšiřující se centrální kanál

4.1.5. Cytokiny 21 dpi

V tomto časovém intervalu byla přítomnost schistosomul opět ověřena pomocí séra z reinfikovaných myší (viz výše obr. 8).

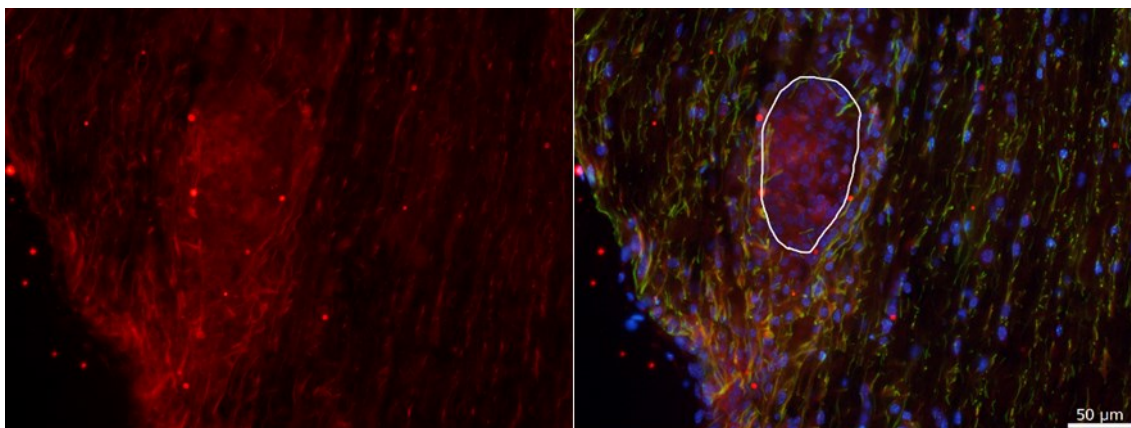
V místě, kde se nacházel degradovaný parazit, bylo pozorováno velké množství hypertrofovaných astrocytů a další buněk. Jen málo z nich bylo RCA I pozitivních, avšak velká část z nich vykazovala reaktivitu s Iba-1, markerem mikroglie/makrofágů (Obr. 12). Tuto protilátku ovšem nebylo možné využít v kombinaci se značením cytokinů IL-1 β a IL-17, pro lepší možnost porovnání byl tedy využíván lektin RCA I ve všech případech.



Obr. 12: Srovnání značení buněk lektinem RCA I a protilátkou proti Iba-1 u různých řezů stejného schistosomula 21 dpi.

jádra (DAPI); a, b — RCA I pozitivní buňky; c, d — mikroglie/makrofágy (Iba-1)

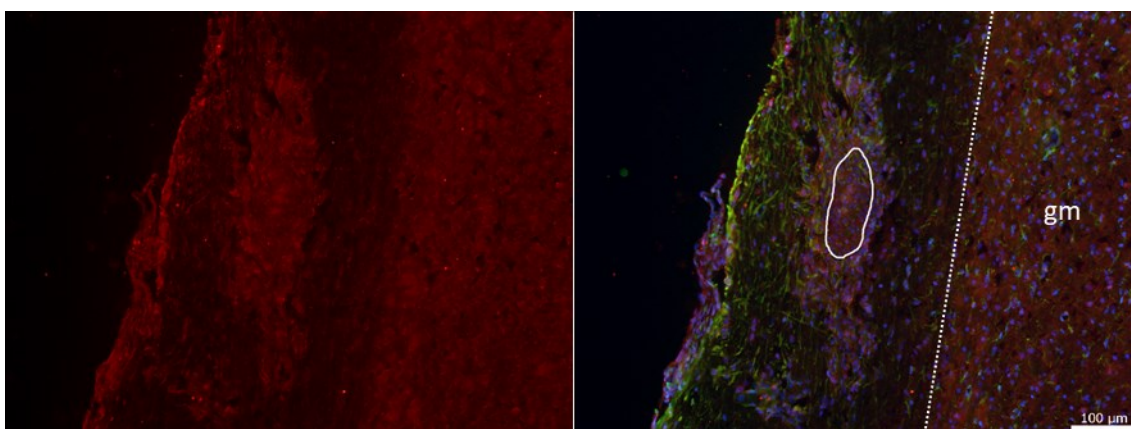
Podobně jako v případě 14 dpi bylo i 21 dpi v okolí degradujícího schistosomula velké množství hypertrofovaných astrocytů. Výsledky napovídají, že byly z velké části zdrojem IL-1 β (Obr. 13).



Obr. 13: Přítomnost IL-1 β v místech s hypertrofovanými astrocyty 21 dpi.

Cytokin (IL-1 β); jádra (DAPI); astrocyty (GFAP); degradující schistosomulum bíle orámováno

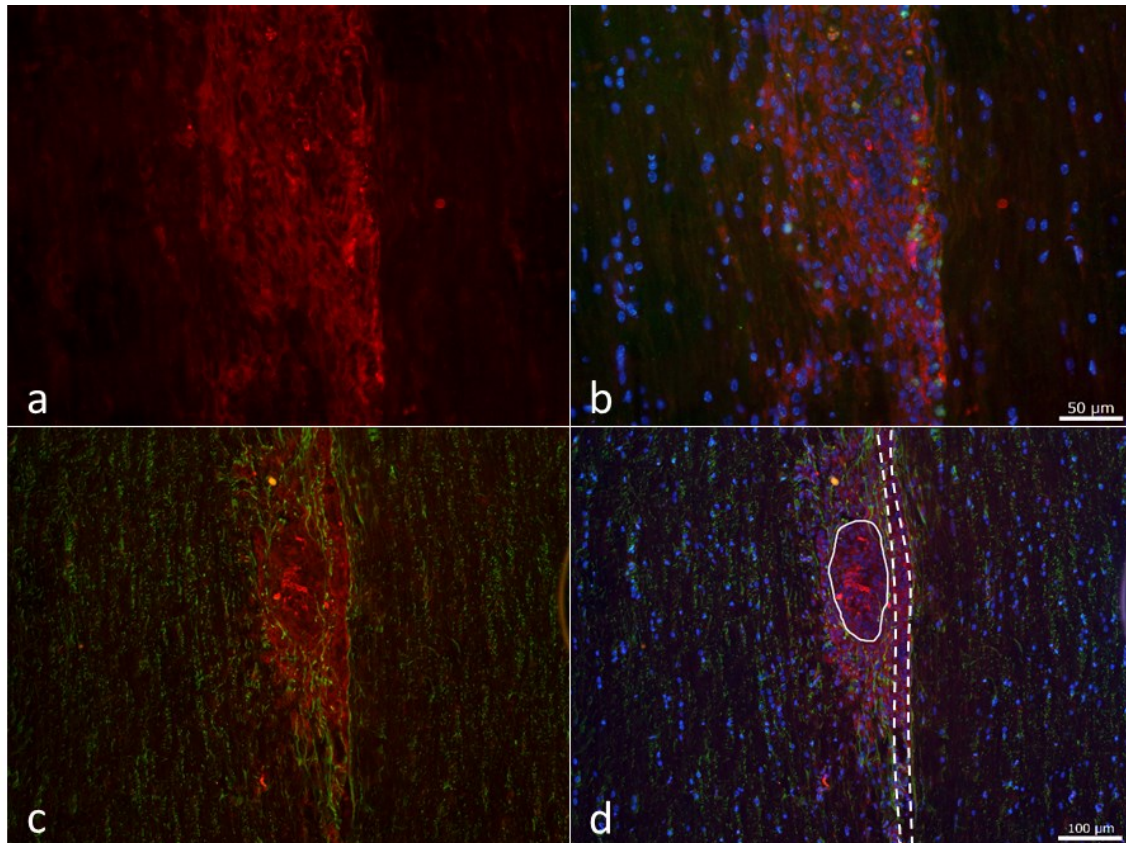
IL-17 byl pozorován opět v širším okolí degradujícího schistosomula, ale v tomto případě byla interpretace výsledků nejasná, jelikož intenzita signálu byla podobná pozadí v šedé hmotě míchy (Obr. 14).



Obr. 14: Nejasná interpretace výsledků se značením IL-17 21 dpi. Signál byl podobný pozadí v šedé hmotě.

cytokin (IL-17); astrocyty (GFAP); jádra (DAPI); degradující schistosomulum bíle orámováno; gm – šedá hmota (hranice wm/gm vyznačena tečkovanou čarou)

Signál pro IL-4 a IL-6 byl rozšířen v okolí degradujícího schistosomula. V něm se vyskytovaly hypertrofované astrocyty (Obr. 15), ale jen minimum RCA I pozitivních buněk. Distribuce cytokinového signálu ovšem odpovídala oblasti, kde se na jiném řezu (viz výše obr. 12) vyskytovaly Iba-1 pozitivní mikroglie/makrofágy.



Obr. 15: Hypertrofované astrocyty a přítomnost IL-4 a IL-6 okolo degradujícího schistosomula v blízkosti mediánní rýhy 21 dpi. *Glia limitans* byla narušená a byl patrný buněčný infiltrát v prostoru rýhy a okolí.

jádra (DAPI) a, b — cytokin (IL-4); RCA I pozitivní buňky; c, d — cytokin (IL-6); astrocyty (GFAP); degradující schistosomulum bíle orámováno plnou čarou; mediánní rýha ohraničena přerušovanou čarou

4.1.6. Shrnutí IHC výsledků

Přítomnost cytokinů v průběhu infekce je shrnuta v Tab. 8. Cytokiny byly prvně zachyceny 7 dpi, kdy byla také pozorována přítomnost RCA I pozitivních buněk a hypertrofizace astrocytů. V tuto dobu byl v těsném okolí parazita pozorován IL-17 a v širším okolí zejména IL-6 a IL-4. O týden později, 14 dpi, byl kolem degradujících schistosomul pozorován kromě výše zmíněných i IL-1 β a hypertrofizace astrocytů byla výraznější. Přítomnost cytokinů a stav astrocytů byl podobný i 21 dpi, nicméně v tento interval nebyly již patrné téměř žádné RCA I pozitivní buňky.

Tab. 8: Porovnání výskytu vybraných cytokinů v průběhu infekce myši *T. regenti*.

V případě 14 dpi jsou výsledky pro IL-4 a IL-6 ovlivněny netradiční lokalizací schistosomula v centrálním kanálu. Rozšíření signálu v okolí schistosomul je vyjádřeno na škále (-) = žádný signál až (+++) = signál rozšířen v širokém okolí

dpi	IL-1 β	IL-6	IL-17	IL-4
3	-	-	-	-
7	-	++	+	++
14	+++	-	+++	-
21	+++	+++	++	+++

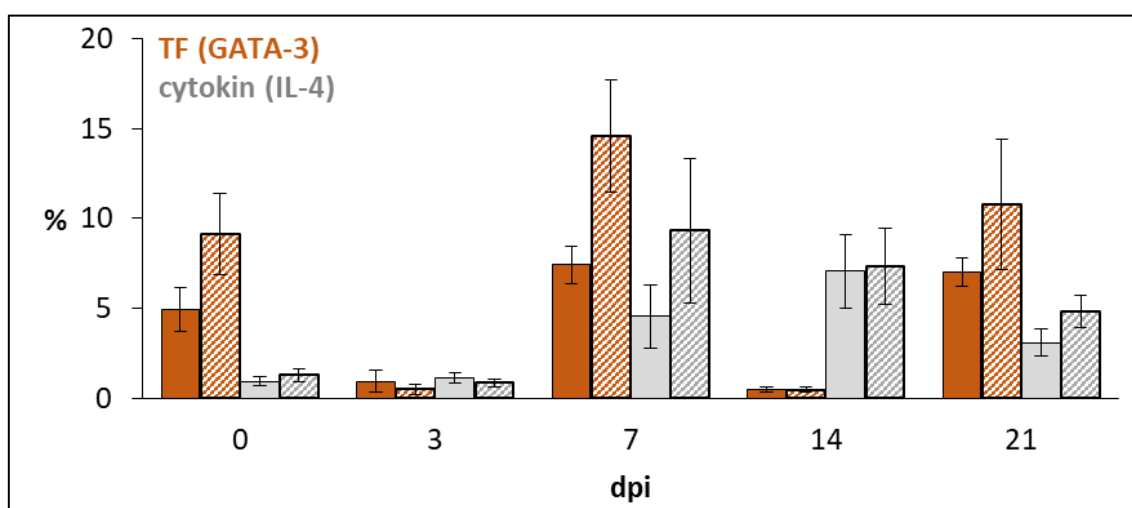
4.2. Cytometrické experimenty

Reakce periferní buněčné imunitní odpovědi myši na nákazu *T. regenti* byla charakterizována fenotypizací splenocytů pomocí průtokové cytometrie. Sledovány byly CD4⁺ a CD4⁻ T lymfocyty a jejich produkce transkripčních faktorů a cytokinů typických pro vybrané T lymfocytární populace. Pro každý časový interval (3, 7, 14 a 21 dpi) byly použity 4 myši infikované ve věku 8 týdnů a 4 neinfikované myši byly usmrceny ve věku 11 týdnů (jejich stáří tak odpovídalo myším zpracovaným 21 dpi) jako zdravé kontroly.

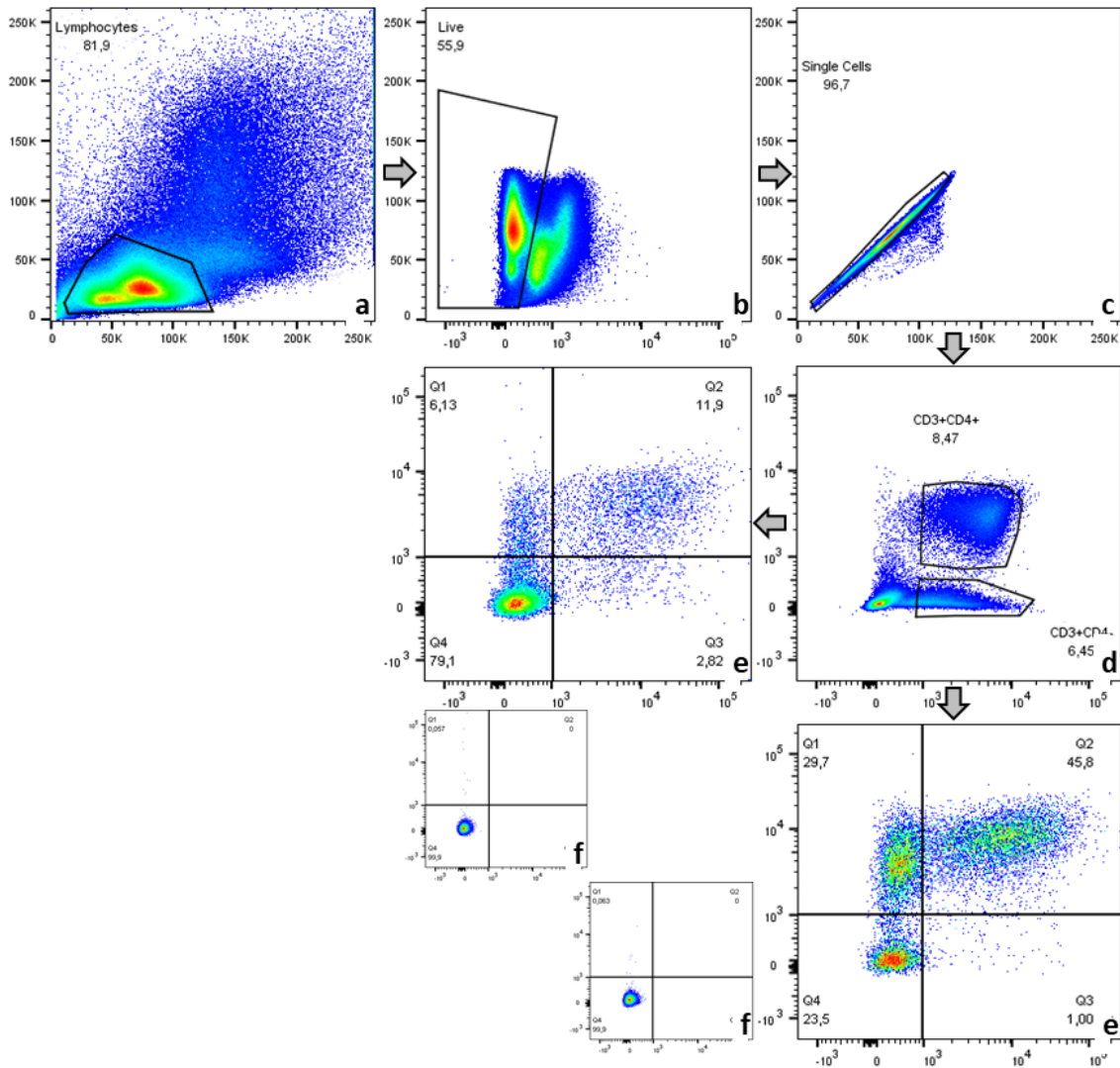
4.2.1. Gatovací strategie

Jednotlivé buněčné populace (a jejich produkce cytokinů a TF) byly definovány na základě gatovací strategie znázorněné na Obr. 17 (na další straně).

Kit pro značení mrtvých buněk neposkytoval během experimentu stabilní výsledky, a tak ho nebylo možné spolehlivě využít pro analýzu myši 3 a 14 dpi. Srovnáním výsledků gatovací strategie s/bez vyřazení mrtvých buněk bylo zjištěno, že zahrnutí mrtvých buněk neovlivňuje výsledné trendy výskytu pozitivních buněk v čase, jen bylo vzhledem k vyššímu výskytu CD3-CD4⁻ událostí číselně nižší procentuální zastoupení pozitivních populací (Obr. 16). Aby bylo možné vzájemně porovnávat jednotlivá měření (3 a 14 dpi vs. 0, 7 a 21 dpi), bylo při finálním zpracování výsledků upuštěno od exkluze mrtvých buněk.



Obr. 16 Srovnání vlivu zahrnutí mrtvých buněk na hodnoty relativního zastoupení daných populací ve slezině na příkladu TF (GATA-3) a cytokinu (IL-4) u Th2 buněk. Plné sloupce — analýza s mrtvými buňkami; vzorované sloupce — analýza s vyloučením mrtvých buněk; $n = 4$

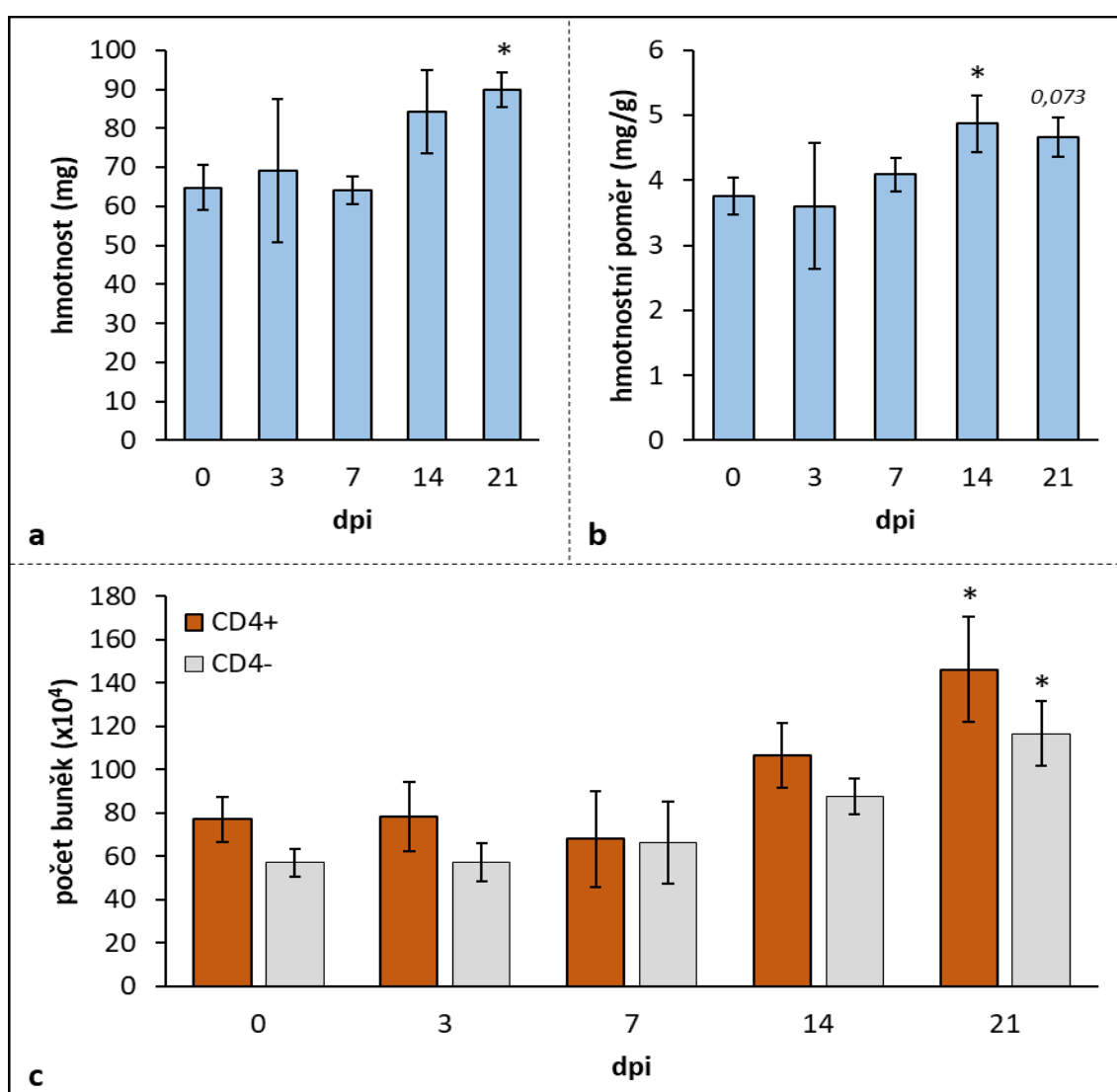


Obr. 17: Gatovací strategie použitá pro analýzu splenocytů.

Podle granularity a velikosti (SSC/FSC) byla vymezena oblast empiricky odpovídající lymfocytům (a), z těchto událostí byly vyloučeny mrtvé buňky (FSC/Live-dead) (b) a poté shluky buněk (FSC-H/FSC-A) (c). Na základě zobrazení CD3 a CD4 pozitivních buněk byly detekovány 2 odlišné populace T lymfocytů, a to CD3+CD4+ a CD3+CD4- (d). U každé z nich bylo analyzováno relativní zastoupení buněk produkujících cytokiny a TF (e). Totožný gating byl využit vždy u všech vzorků při detekci stejné buněčné populace. Správnost stanovení hranice mezi pozitivní a negativní populací byla ověřena zobrazením izotypové kontroly k příslušnému TF (viz přílohy Obr. p3) (f). Případné artefakty způsobené autofluorescencí vzorku byly vyloučeny změřením neznačeného vzorku.

4.2.2. Hmotnost sleziny a celkové počty izolovaných T lymfocytů

V průběhu infekce mírně narůstala hmotnost sleziny, a to jak absolutně (Obr. 18a), tak i relativně vůči tělesné hmotnosti myši (Obr. 18b). Hmotnost sleziny nekorelovala věkem myši ($r_s = 0,30$, $p = 0,21$), ale pozitivně korelovala s délkou infekce ($r_s = 0,65$, $p = 0,002$). Během infekce se ve slezině zvyšoval počet CD4+ i CD4- T lymfocytů (Obr. 18c), v obou případech jejich počet koreloval s hmotností sleziny (CD4+ $r_s = 0,82$, $p < 0,0001$, CD4- $r_s = 0,75$, $p = 0,0002$). Ve čtvrtině případů byla ve slezině pozorována melanóza zasahující zhruba 1/3 orgánu, nicméně tento jev neměl na žádný z pozorovaných parametrů vliv.



Obr. 18: Změny hmotnosti sleziny a počtu T lymfocytů v průběhu infekce.

a — absolutní hmotnost sleziny, **b** — relativní hmotnost sleziny vůči tělesné hmotnosti myši, **c** — počet lymfocytů ve slezině; sloupce ukazují průměr a směrodatnou odchylku ($n = 4$); * $p < 0,05$, příp. uvedena kurzívou

4.2.3. Dynamika CD4+ populací v průběhu infekce

Vybrané populace CD4+ T lymfocytů (Th1, Th2, Th17 a Treg) byly charakterizovány na základě produkce cytokinů a TF a výsledné hodnoty byly pro každý parametr zvlášť vyneseny do grafů. Vliv stimulace buněk na produkci cytokinů/TF byl ověřen paralelní kultivací buněk s kontrolní směsí namísto stimulační. U těchto buněk nebyl detekován žádný z pozorovaných cytokinů a zastoupení buněk produkujících vybrané TF bylo nižší než v případě kultivace se stimulační směsí. Dále jsou proto prezentovány pouze výsledky získané z buněk inkubovaných ve stimulační směsi (PMA/ionomycin).

Th1 (Obr. 19)

Podíl T-bet+ buněk i IFN γ + buněk byl ve slezině oproti zdravé kontrole snížen 3 dpi. Nejvyššího zastoupení naopak dosahoval 7 a 14 dpi, přičemž v prvně jmenovaném bodě byla jasně definovaná populace dvojitě pozitivních (T-bet+ IFN γ +) buněk. Poté (21 dpi) zastoupení buněk produkujících T-bet či IFN γ klesalo, v případě T-bet šlo o pokles na úroveň zdravých myší.

Th2 (Obr. 20)

V případě znaků typických pro Th2 buňky byla pozorována odlišná dynamika pro GATA-3+ buňky a IL-4+ buňky. V prvním případě byl průběh kolísavý s propady pod úroveň zdravých kontrol 3 a 14 dpi a vzestupy mírně nad tuto úroveň 7 a 21 dpi. Oproti tomu zastoupení IL-4+ buněk postupně rostlo až do 14 dpi. V bodě 7 dpi byla jasně definovaná populace dvojitě pozitivních (GATA-3+ IL-4+) buněk.

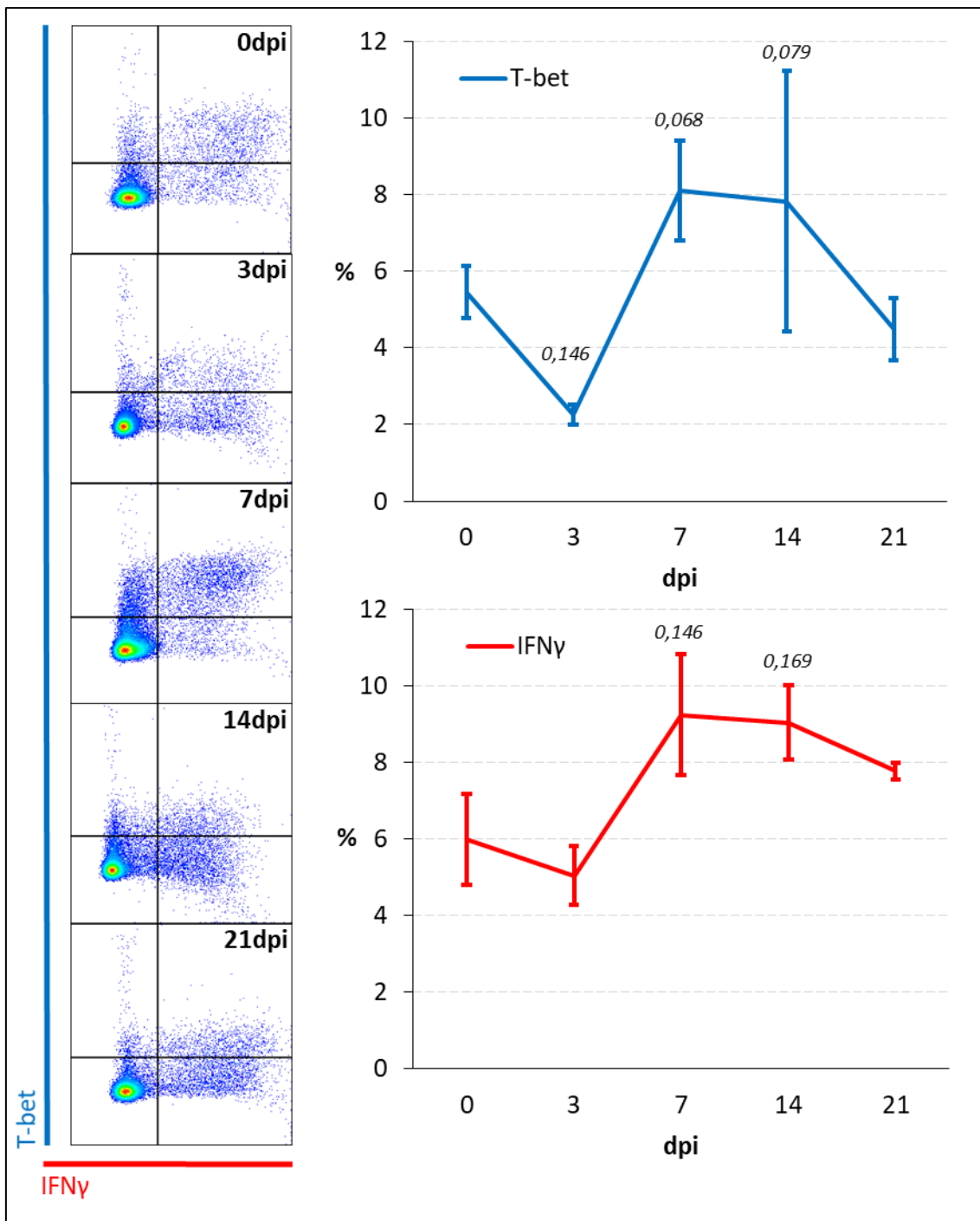
Th17 (Obr. 21)

V průběhu infekce byl výskyt ROR γ t+ i IL-17+ buněk ve srovnání s relativním zastoupením markerů ostatních populací velmi nízký. ROR γ t+ buňky vykazovaly podobnou dynamiku jako GATA-3+ buňky se signifikantním poklesem 14 dpi. Naopak IL-17+ buňky v tomto bodě zaznamenaly signifikantní nárůst. Populace dvojitě pozitivních (ROR γ t+ IL-17+) buněk byla poměrně zřetelně definovaná 21 dpi, avšak ani jeden z markerů nebyl produkován více než u zdravých myší.

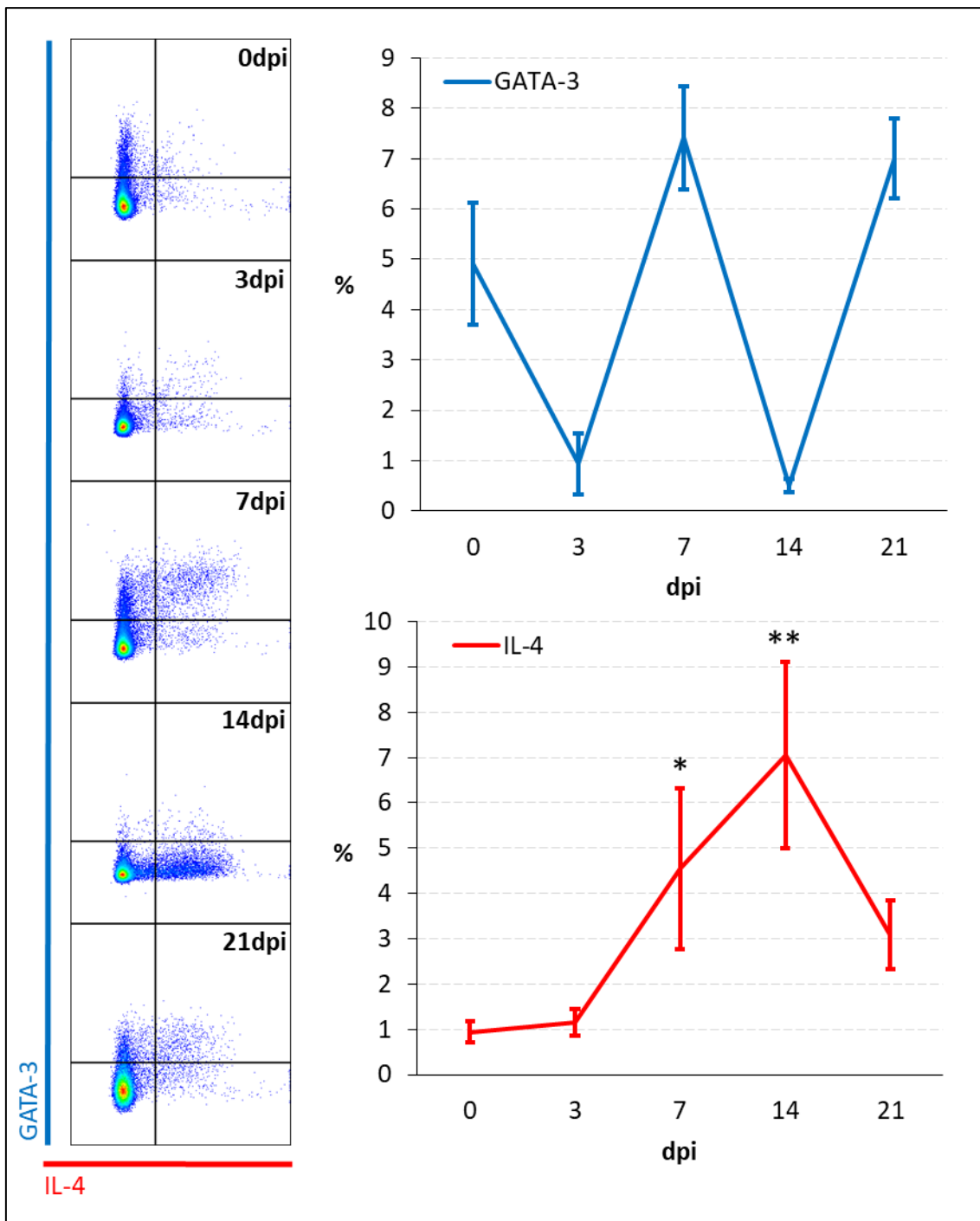
Treg (Obr. 22)

Na rozdíl od TF ostatních měřených buněčných populací nebylo v porovnání se zdravou kontrolou zastoupení Foxp3+ buněk sníženo 3 dpi. K signifikantnímu poklesu došlo až 14 dpi. Podobně jako v předchozích případech byly 21 dpi hodnoty TF srovnatelné se zdravou skupinou. Opačný trend byl pozorován pro IL-10+ buňky, jejichž zastoupení dosahovalo maxima 7 a 14 dpi. Detekce povrchového markeru CD25 nebyla v žádném případě úspěšná a do budoucna vyžaduje úpravu protokolu.

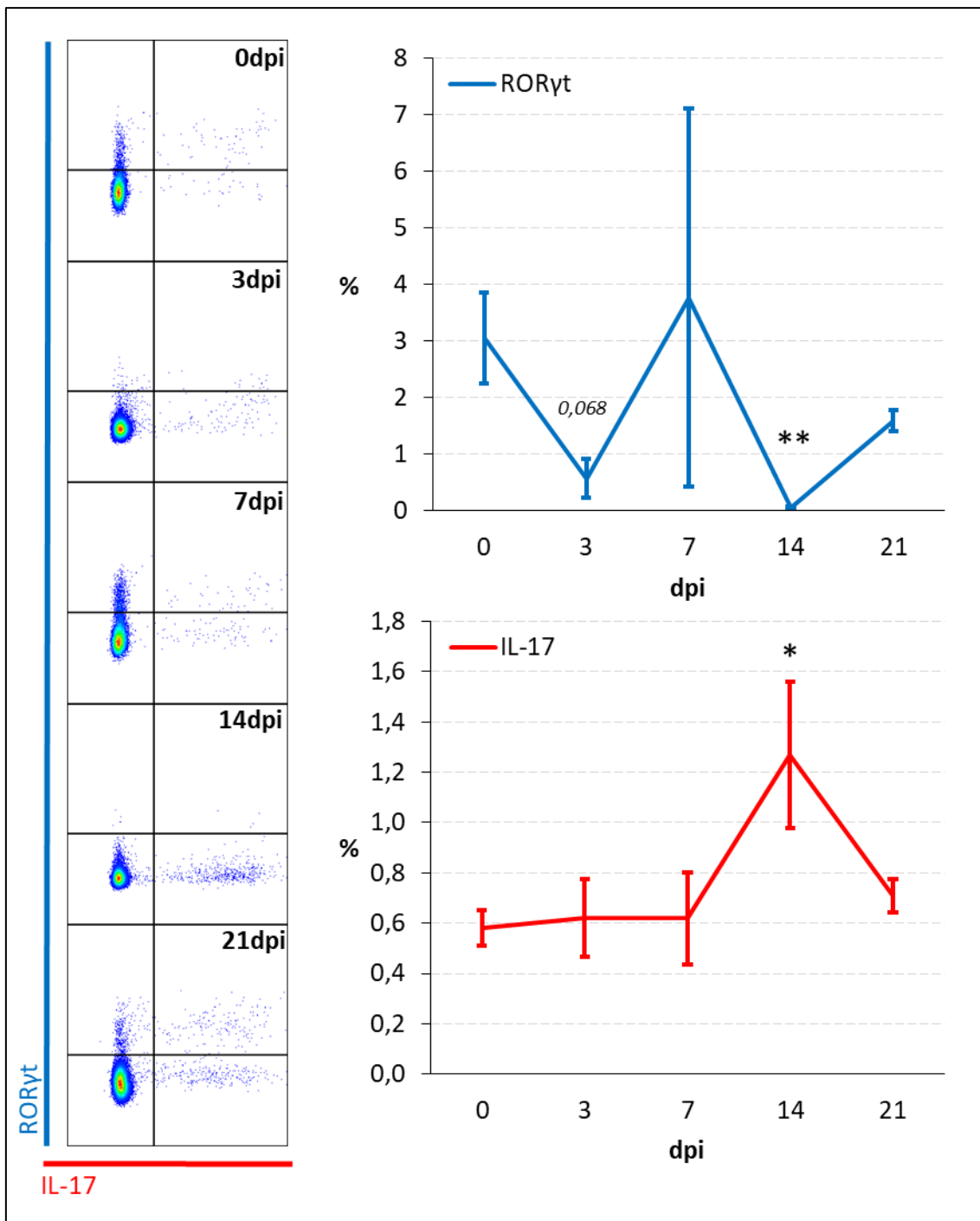
Vzhledem k malým výtěžkům, co se týče detekce buněk produkujících IL-10, byl kromě BFA pro zastavení intracelulárního transportu proteinů testován i Mon. Na pozorovaný trend produkce TF a cytokinů v čase v porovnání s BFA ovšem tento krok neměl výrazný vliv, výsledky korelovaly s těmi získanými při použití BFA (Foxp3 $r_s = 0,5852$, $p = 0,0067$; IL-10 $r_s = 0,6912$, $p = 0,0007$). V případě Foxp3 bylo pozorováno dokonce méně Foxp3+ buněk (viz přílohy Obr. p4).



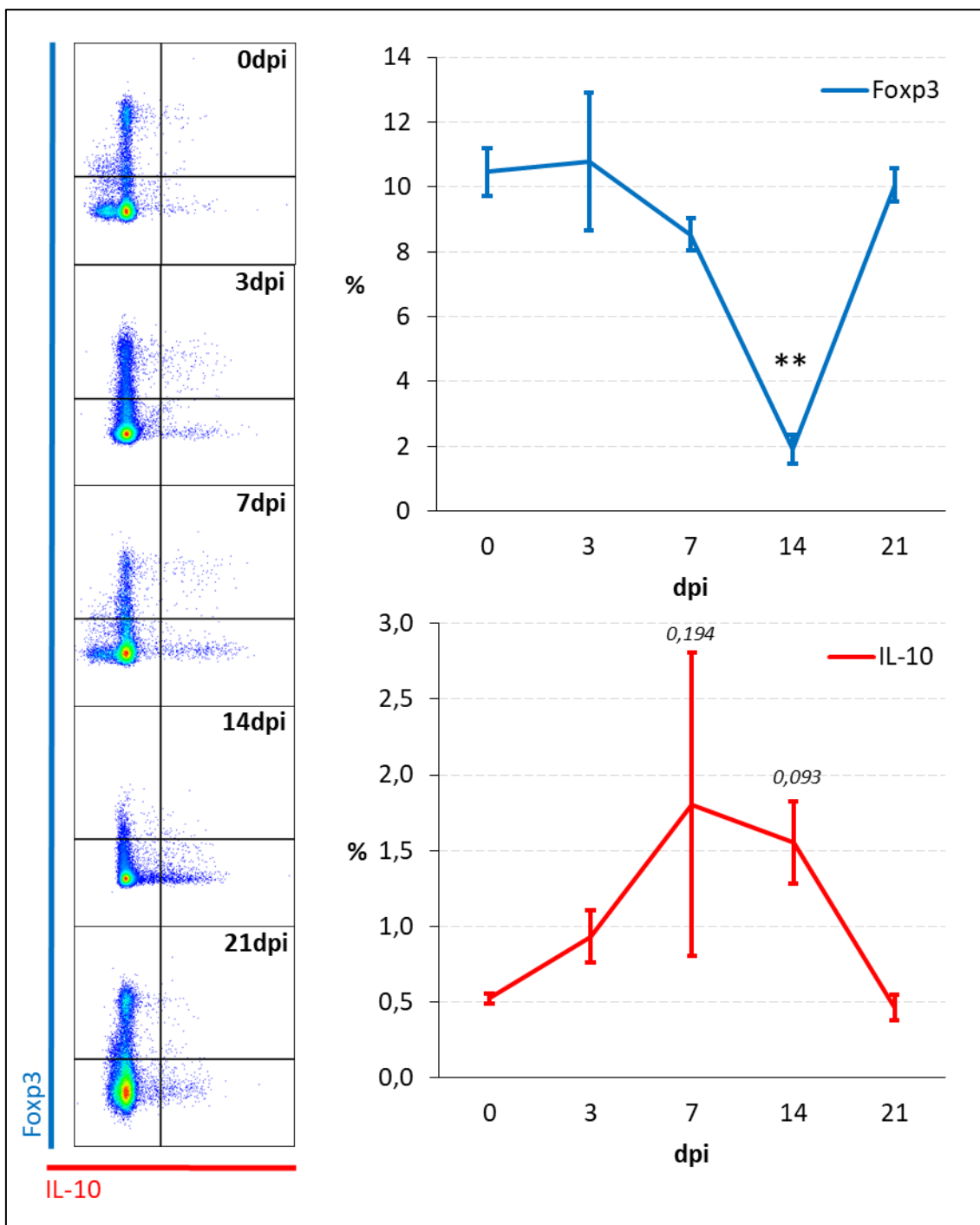
Obr. 19: Podíl CD4⁺ T-lymfocytů produkujících T-bet a IFN γ (markery Th1) mezi splenocyty myši nakažených *T. regentii* a reprezentativní dotploty; jednotlivé body ukazují průměry se směrodatnou odchylkou ($n = 4$); p hodnota uvedena kurzívou



Obr. 20: Podíl CD4+ T-lymfocytů produkujících GATA-3 a IL-4 (markery Th2) mezi splenocyty myši nakažených *T. regenti* a reprezentativní dotploty; jednotlivé body ukazují průměry se směrodatnou odchylkou ($n = 4$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$



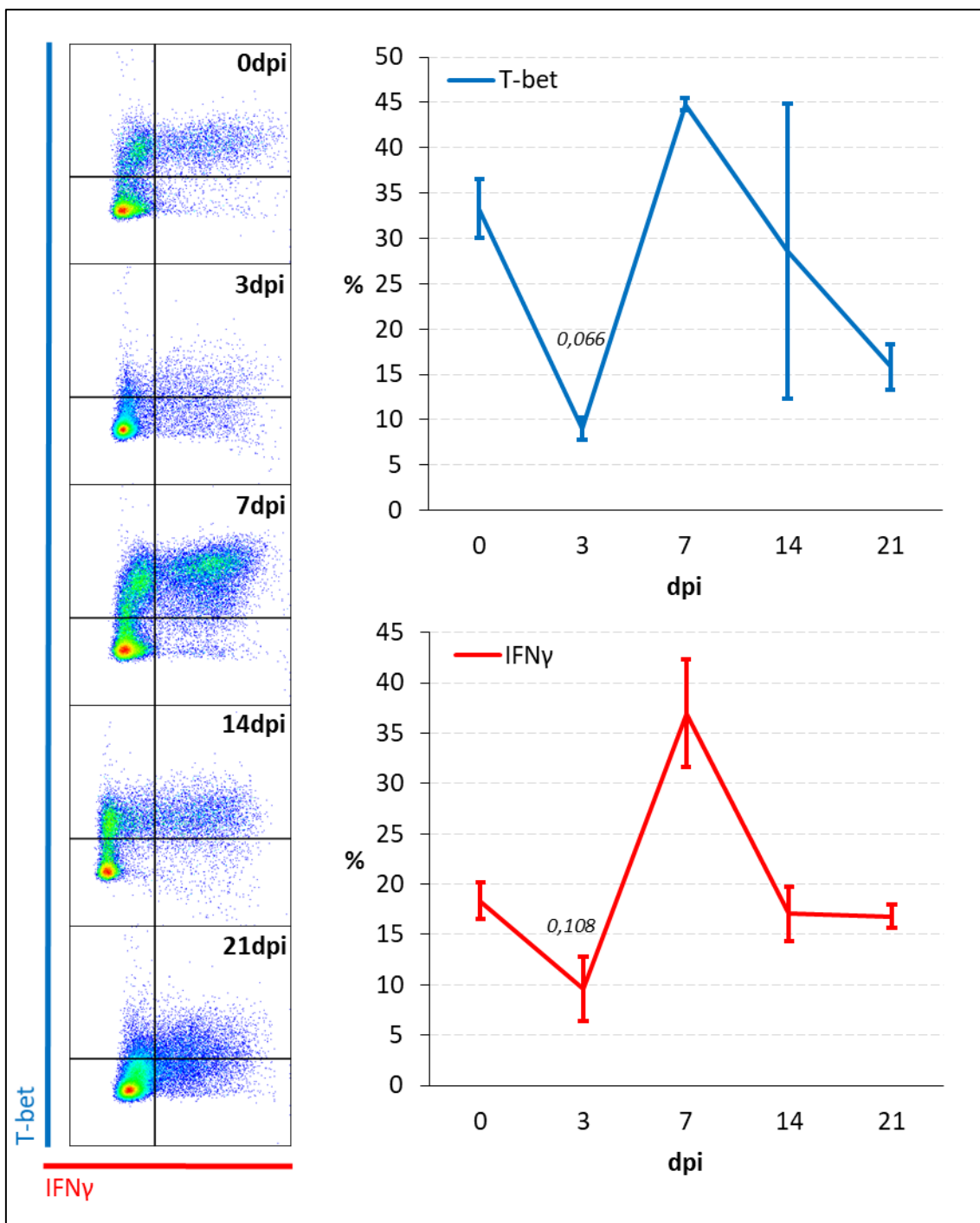
Obr. 21: Podíl CD4⁺ T-lymfocytů produkujících RORγt a IL-17 (markery Th17) mezi splenocyty myši nakažených *T. regenti* a reprezentativní dotploty; jednotlivé body ukazují průměry se směrodatnou odchylkou ($n = 4$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, příp. hodnota uvedena kurzívou



Obr. 22: Podíl CD4+ T-lymfocytů produkujících Foxp3 a IL-10 (markery Treg) mezi splenocyty myši nakažených *T. regenti* a reprezentativní dotploty; jednotlivé body ukazují průměry se směrodatnou odchylkou ($n = 4$); ** $p < 0,01$, příp. hodnota uvedena kurzívou

4.2.4. Dynamika CD4- populace během infekce

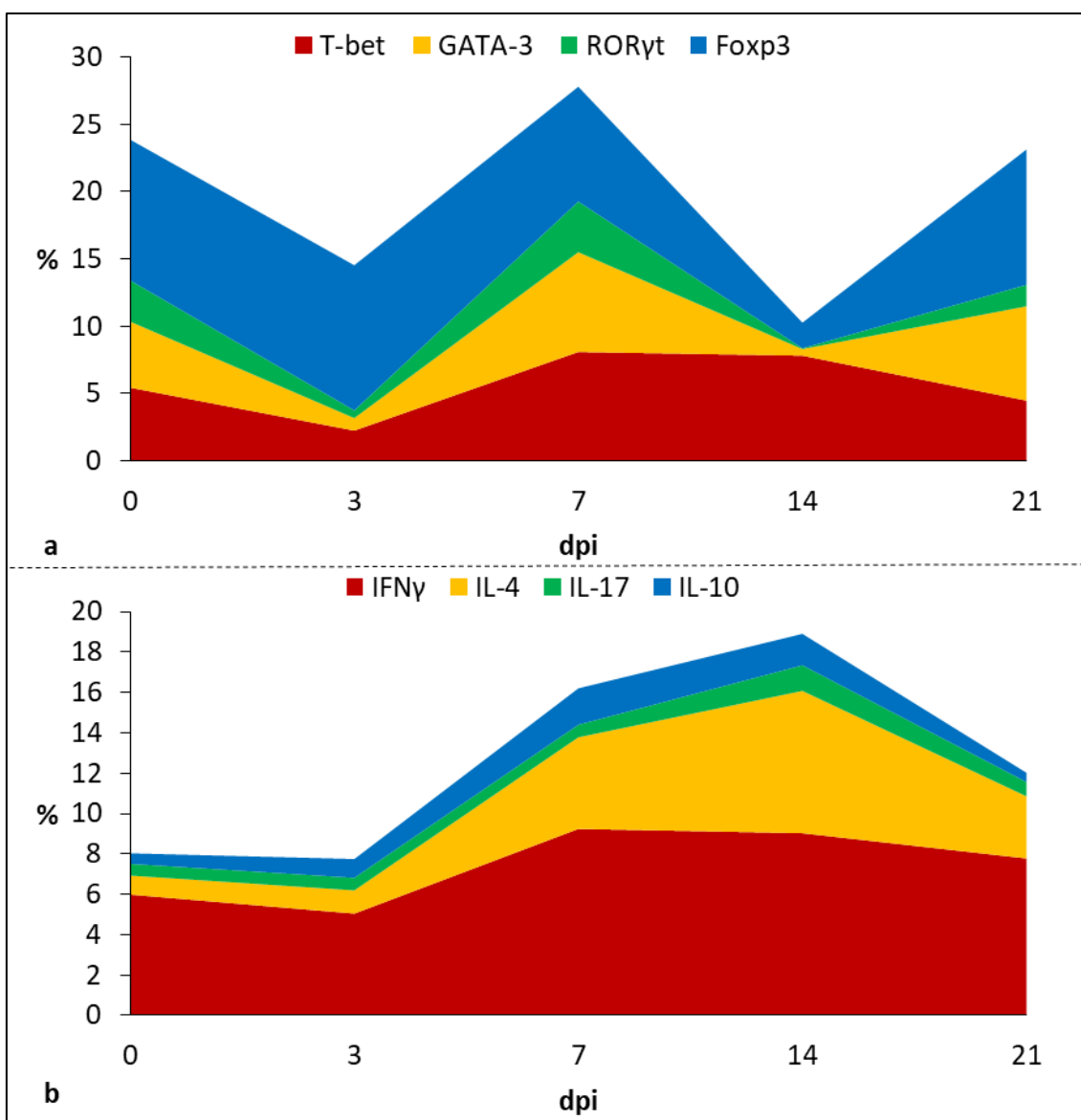
V průběhu infekce byl pozorován i vysoký počet CD4- T lymfocytů, přičemž značná část z nich produkovala T-bet a $IFN\gamma$ (Obr. 23). Podobně jako v případě Th1 buněk i v případě CD4- buněk bylo zastoupení buněk produkujících tyto markery nižší 3 dpi a svého maxima dosahovalo 7 dpi. Poté (14 a 21 dpi) jejich podíl klesal, v případě T-bet dokonce pod úroveň kontrolní skupiny. Ostatní sledované markery (IL-4, IL-10, IL-17, GATA-3, Foxp3 a $ROR\gamma t$) byly v rámci CD4- T-lymfocytů po celou dobu infekce blízké nule.



Obr. 23: Podíl CD4- T-lymfocytů produkujících T-bet a IFN γ mezi splenocyty myši nakažených *T. regenti* a reprezentativní dotploty; jednotlivé body ukazují průměry se směrodatnou odchylkou ($n = 4$); p hodnota uvedena kurzívou

4.2.5. Shrnutí výsledků z cytometrie

V průběhu infekce docházelo ke zvětšování sleziny a narůstání počtu T lymfocytů. Zastoupení TF pro Th1, Th2 i Th17 v průběhu infekce nevykazovalo stabilní trend. V případě Treg došlo k poklesu jen 14 dpi a pak opět k návratu do hodnot typických pro zdravé myši. Množství buněk produkujících cytokiny specifické pro dané populace bylo nejvyšší 7 a 14 dpi. Poté se většinou podobně jako v případě TF blížilo k hodnotám zdravých myši (shrnutí v Obr. 24). T-bet i $\text{IFN}\gamma$ u CD4- buněk vykazovalo podobný trend jako v případě Th1 buněk.



Obr. 24: Shrnutí produkce TF (a) a cytokinů (b) CD4+ buňkami sleziny myši nakažených *T. regenti*

5. Diskuze

Neuropatogenní motolice *T. regenti* je zajímavým modelem pro výzkum parazitárních neuroinfekcí již bezmála 20 let (Horák et al., 1999). I když dosavadní studie naznačují, že za její neúspěšný vývoj v savcích je zodpovědná hostitelova imunitní odpověď (Hrádková & Horák, 2002; Kouřilová et al., 2004a; Kouřilová et al., 2004b; Lichtenbergová et al., 2011), nebyl dosud identifikován konkrétní mechanismus vedoucí k eliminaci infekce. Jelikož jsou cytokiny významnými mediátory imunitní odpovědi, ověřili jsme v této práci přítomnost vybraných cytokinů v nakažené nervové tkáni a charakterizovali jsme změny v zastoupení vybraných subpopulací T lymfocytů ve slezině infikovaných zvířat. Přínosem práce je i popis a kvantifikace migrace *T. regenti* v myších kmene C57BL/6J, o čemž bylo publikováno jen minimum výsledků (Chanová & Hrdý, 2016).

5.1. Migrace *T. regenti* v myších C57BL/6J a reakce gliových buněk

Pro popis migrace *T. regenti* v CNS myši byl nejčastěji používán imunokompetentní kmen BALB/c (Horák et al., 1999; Hrádková & Horák, 2002; Kouřilová et al., 2004b; Lichtenbergová et al., 2011). Výsledky této práce sledující migraci *T. regenti* v kmeni C57BL/6J, který je v naší laboratoři pro imunologický výzkum recentně využíván, neprokázaly mezi těmito kmeny významné rozdíly. Lokalizace schistosomul 3 dpi především v bederní a hrudní části míchy a v pozdějších časových intervalech v hrudní i krční části míchy byla srovnatelná s výsledky Hrádkové a Horáka (2002), kteří podrobně charakterizovali migraci v kmeni BALB/c. Ačkoliv autoři nevybrali v pozdějších fázích infekce intervaly použité v naší práci, lze z jejich výsledků ze dnů blízkých těmto intervalům tento trend předpokládat. Z porovnání také vyplývá, že v našem případě bylo nalezeno méně schistosomul. To nemusí být způsobeno odlišnou vnímavostí myši k nákaze, ale například i podanou nižší infekční dávkou (Horák a Hrádková (2002) používali až pětinasobně vyšší infekční dávku) a také námi zvoleným vyšetření míchy z kryožezů. Při něm mohlo dojít k přehlédnutí některých schistosomul, zejména v submeningeálním prostoru. Toto pozorování je v rozporu s výsledky Chanové a Hrdého (2016), kteří se domnívají, že predispozice myši kmene C57BL/6 k Th1 odpovědi naopak zvyšuje počet parazitů migrujících v CNS, ba dokonce jejich migraci urychluje. Nezanedbatelným faktorem je také použití odlišného kmene *T. regenti*, jelikož jak

naznačují předchozí experimenty v naší laboratoři, jednotlivé kmeny se mohou lišit svojí virulencí (Macháček et al., 2016, Krčmářová, 2017).

Schistosomula byla v míše nalezena především v bílé hmotě (16 ze 22), nižší množství pak bylo pozorováno v submeningeálních prostorech, centrálním kanálu, šedé hmotě nebo v jejím rozhraní s hmotou bílou. Tyto výsledky odpovídají situaci u myši BALB/c (Bulantová et al., 2016; Chanová & Hrdý, 2016) a preference migrace bílou hmotou byla pozorována i u kachny jakožto definitivního hostitele, byť v tomto případě autoři uvádějí data jen z jednoho experimentálního zvířete (Bulantová et al., 2016). Paraziti mohou bílou hmotu upřednostňovat, jelikož jsou schopni přijímat a trávit myelin (Dolečková et al. 2009, Lichtenbergová et al. 2011). Na druhou stranu, se v bílé hmotě snadněji rozvine zánět, což může vést k jejich usmrcení (Popovich et al., 1997).

Během infekce BALB/c myši *T. regenti* dochází k aktivaci astrocytů a mikroglíí, rezidentních imunokompetentních buněk CNS (Lichtenbergová et al., 2011). U C57BL/6J myši jsme reakci RCA I+ buněk (~ mikroglíí, viz dále) a astrocytů na migrující schistosomulum v míše pozorovali nejdříve 7 dpi, kdy v jejich okolí byly přítomny astrocyty s prodlouženými buněčnými výběžky a také mikroglie. Ty byly akumulovány především kaudálně za schistosomuly. Lze předpokládat, že to je oblast, kudy parazit migroval. Takový migrační kanál tvořený aktivovanými mikroglíemi pozorovali u BALB/c myši infikovaných *T. regenti* i Lichtenbergová et al. (2011). Buněčný infiltrát v migračním kanálu parazita, tvořený mikroglíemi/makrofágy, T lymfocyty a NK (z angl. natural killer) buňkami popsali i Cardona et al. (1999) u myši infikovaných *M. corti*. Autoři předpokládali, že se v této oblasti nacházely parazitární antigeny stimulující buněčnou imunitní odpověď (Cardona et al. 1999), příp. se může jednat o reakci imunitních buněk na poškození axonů, které bylo od 7 dpi v migračním kanálu schistosomul pozorováno (Lichtenbergová et al., 2011).

Absenci reakce gliových buněk i jiného buněčného infiltrátu kolem schistosomula 3 dpi lze přirovnat k situaci u nepoškozeného cysticerku *T. solium* (Restrepo et al., 1998), který také neindukuje tvorbu zánětu. Nelze však vyloučit, že absence aktivace či akumulace imunitních buněk je v případě *T. regenti* 3 dpi způsobena tím, že jde o velmi časnou fázi infekce, kdy paraziti přestupují z periferních nervů do CNS (Lichtenbergová et al., 2011).

Nepoškozené bylo nalezeno i jedno ze schistosomul 14 dpi. Nacházelo se v centrálním míšním kanálu a gliové buňky v okolí nevykazovaly žádnou zvýšenou aktivitu oproti zdravým myším, jen centrální kanál byl mírně rozšířen. Podobná situace

byla popsána i u schistosomula nalezeného ve 4. komoře mozkové (Lichtenbergová et al., 2011). Absence buněčné imunitní odpovědi v těchto případech může být způsobena minimálním porušením tkáně CNS a také omezeným kontaktem parazitárních antigenů s rezidentními imunokompetentními buňkami CNS, především mikroglie.

V ostatních případech intervalů 14 dpi a 21 dpi byla schistosomula již výrazně poškozena, což odpovídá výsledkům z BALB/c myši (Lichtenbergová et al., 2011). V jejich okolí se nacházelo značné množství hypertrofovaných astrocytů s dlouhými buněčnými výběžky. Lze předpokládat, že okolo degenerujících parazitů a případně poškozené tkáně docházelo k tvorbě gliové jizvy, která je tvořena především právě astrocyty a má za úkol izolovat patogen a poškozenou tkáň v CNS od zdravé (Roitbak & Syková, 1999). Gliová jizva byla pozorována i okolo degenerujících cysticerek *T. solium* společně s granulomem tvořeným z velké části mikroglie/makrofágy (Restrepo et al., 2001; Alvarez et al., 2002). V čase 21 dpi nebyly kolem degenerujícího schistosomula překvapivě detekovány žádné RCA I+ mikroglie, ač protilátka proti Iba-1, typickému markeru mikroglie/makrofágů (Ito et al., 1998), ukázala jejich početné zastoupení. Příčinou ztráty signálu lektinové sondy může být dystrofie mikroglie. Vazba RCA I na takové mikroglie totiž nebyla potvrzena (Kettenmann a Ransom, 2013, s. 90). Pro verifikaci by bylo ovšem nutné, zopakovat tento experiment i s jinými šaržemi lektinu RCA I. V případě pozice schistosomula poblíž mediánní rýhy 21 dpi bylo pozorováno narušení meningů a mohutný buněčný infiltrát nejen v okolí parazita v parenchymu, ale i v blízkém okolí v mediánní rýze. Předpokládáme, že by se mohlo jednat o buňky migrující z periferní krve do likvoru, odkud následně infiltrují nervovou tkáň.

Největší buněčný infiltrát podobně jako v případě lidské NCC (Restrepo et al., 2001; Alvarez et al., 2002) byl okolo degenerujících parazitů i v našem pozorování. Také okolo rozpadajících se vajíček schistosomy *S. japonicum* při experimentální nákaze králíků byl popsán granulom skládající se z neutrofilů, eozinofilů a lymfocytů (Wang et al., 2011). Buněčný infiltrát okolo parazita v CNS byl prokázán i při experimentálních infekcích myši *M. corti* (Cardona et al., 1999), autoři ovšem neuvádí vztah k poškození parazita. V mozkovém parenchymu pozorovali okolo parazita akumulaci T lymfocytů, NK buněk a makrofágů. Za makrofágy ovšem označovali všechny CD11b+ buňky a stejnou molekulu mají na svém povrchu i mikroglie (Akiyama & McGeer, 1990). Na rozdíl od zmíněných příkladů a výsledků našich experimentů nebyla pozorována tvorba granulomu okolo larev *T. canis* (Fioretti et al., 1989). To může být způsobeno zvýšenou

pohyblivostí larev na rozdíl od modelů NCC a neuroschistosomózy a zároveň více než 4x menší velikosti parazita (Liao et al., 2008) v porovnání s *T. regenti* v našem pozorování.

Výsledky této práce tedy neprokázaly významný rozdíl v chování parazitů v myším kmenu C57BL/6J ve srovnání s BALB/c ani v reakci gliových buněk. Ta byla pozorována až 7 dpi a s postupem času a degenerací parazita se buněčný infiltrát rozšiřoval. Pro budoucí studie bude prospěšná kvantifikace schistosomul v míše v průběhu infekce, která byla u tohoto kmenu pro vybrané časové intervaly publikována poprvé právě v této práci, založená na větším počtu vyšetřených myší.

5.2. Cytokiny v okolí schistosomul v CNS

Cytokiny významně regulují lokální i systémovou imunitní odpověď, a tak spolurozhodují o průběhu infekce, způsobu eliminace parazita, ale ovlivňují i míru poškození tkání hostitele (McSorley & Maizels, 2012; Taylor et al., 2012). Jejich *in vivo* produkce byla u nálezů *T. regenti* popsána jen v kůži myší, kde docházelo k sekreci Th1 (IFN γ), Th2 (IL-4) i Treg (IL-10) cytokinů (Kouřilová et al., 2004b). V CNS, kde umírají schistosomula uniknuvší periferní imunitní odpovědi, však cytokinové prostředí známé není.

Poprvé byla přítomnost cytokinů detekována až 7 dpi, což korelovalo s námi pozorovaným nástupem aktivace astrocytů a mikroglíí. I další studie uvádějí rozvoj zánětu a tkáňové patologie až ne dříve než 7 dpi (Kouřilová et al., 2004a; Lichtenbergová et al., 2011; Krčmářová, 2017). Nejsilnější signál jsme 7 dpi pozorovali u IL-4 a IL-6, které vykazovaly v dalším průběhu infekce veskrze totožnou lokalizaci. V případě submeningeální lokalizace 7 dpi byla přítomnost obou cytokinů patrná v těsném okolí parazita a ve větším rozsahu zejména za migrujícím schistosomulem, zatímco v bílé hmotě, a zejména v blízkosti cév, byl signál distribuován v širším okolí parazita. Na základě kolokalizace fluorescenčního signálu se lze domnívat, že IL-6 produkovaly z velké části mikroglie, naopak na produkci IL-4 se častěji podílely i další blíže neurčené buňky.

Mohlo se jednat o buňky infiltrované z periferního imunitního systému, jelikož ty se patrně výraznou měrou podílely na produkci obou zmiňovaných cytokinů i v okolí a uvnitř narušené mediánní rýhy poblíž parazita 21 dpi. Výskyt těchto cytokinů byl rozšířen v oblasti, kde se vyskytovaly Iba-1+ buňky. To je sice používaný marker pro mikroglie, ale značí i další buňky myeloidní linie, jako jsou makrofágy (Ito et al., 1998).

Kolokalizaci navíc nebylo možné potvrdit, jelikož tato protilátka nešla použít (vzhledem ke stejnému původu) v kombinaci se značením IL-4 a IL-6. Mimo makrofágy byly v CNS v průběhu infekce *T. regenti* z periferních buněk pozorovány i T lymfocyty (Lichtenbergová et al., 2011) a granulocyty (Macháček et al., 2018). Pro ověření jejich produkce vybraných cytokinů by bylo potřeba využít specifické značení pomocí IHC nebo na průtokovém cytometru.

Bohužel vzhledem k nízkému počtu nalezených schistosomul v myších 14 dpi nejsou výsledky pro IL-4 a IL-6 zcela vypovídající, resp. dobře reprezentující produkci cytokinů v míšním parenchymu. Tyto cytokiny byly totiž značeny na řezech se schistosomulem migrujícím centrálním kanálem, okolo kterého podobně jako v případě gliových buněk nebyla patrná ani reakce v podobě produkce cytokinů. Proto by bylo vhodné experiment s intervalem 14 dpi zopakovat a najít schistosomula v míšním parenchymu, aby byla data úplná a lépe porovnatelná.

Produkce IL-6 mikroglie mohla být vyvolána exkrečně sekrečními produkty schistosomul, jejichž komponenty stimulovaly produkci tohoto cytokinu mikroglie i v *in vitro* systému (Macháček et al., 2016). Na druhou stranu, *in vitro* byla pozorována produkce IL-6 i astrocyty v reakci na živá schistosomula nebo solubilní frakci jejich homogenátu. To v našem případě podíl astrocytů na produkci IL-6 navzdory očekávání prokázán nebyl. Produkovaný IL-6 se nicméně může podílet na hypertrofizaci astrocytů a tvorbě gliové jizvy (Swartz et al., 2001). Ke zvyšující se expresi IL-6 v CNS docházelo i v průběhu infekce myši *T. canis* (Othman et al., 2010) a byl produkován i hypertrofovanými astrocyty tvořícími gliovou jizvu v okolí cév se zvýšenou propustností v případě infekce myši *M. corti* (Alvarez & Teale, 2006). V těsném okolí tohoto parazita ovšem IL-6 také pozorován nebyl (Cardona et al., 1999). Zdá se tedy, že v případě infekce myši *T. regenti*, ale i dalšími parazity má IL-6 protektivní efekt a podílí se na opravě poškozené nervové tkáně.

V granulomu tvořeném okolo metacestodů *T. solium* (Restrepo et al., 2001) i *M. corti* byl pozorován IL-4. Autoři ovšem neuvádí, jaké buňky ho produkovaly, jen ho pozorovaly ve stejných místech, kde se na paralelních řezech nacházely $\gamma\delta$ T lymfocyty a mikroglie/makrofágy (Cardona et al., 1999). T lymfocyty byly prokázány v malém množství i v okolí schistosomula *T. regenti* (Lichtenbergová et al., 2011), proto nelze vyloučit, že na produkci IL-4 se podílely i tyto buňky. IL-4 v případě helmintární střevní infekce byl produkován i vrozenými lymfoidními buňkami 2. typu a vedl k proliferaci Th2 buněk (Pelly et al., 2016). Produkce IL-4 tak může způsobovat potlačení zánětlivých

procesů v CNS a tím omezení patologie. Tento efekt byl prokázán i v případě infekce CNS parazitickým protistem *Toxoplasma gondii*. Na druhou stranu vedl ovšem ke zvýšené infestaci tkáně (Roberts et al., 1996).

Navzdory *in vitro* systému (Macháček et al., 2016) jsme v našich experimentech pozorovali zvýšené množství IL-1 β , ovšem až v okolí degenerujících schistosomul 14 a 21 dpi. Tento cytokin byl produkován hypertrofovanými astrocyty a jeho přítomnost mohla být způsobena dlouhodobějším působením mrtvého patogenu v CNS kromě mikroglíí a astrocytů i na řadu dalších buněk. Tyto podmínky by v *in vitro* systému bylo obtížné navodit. IL-1 β je důležitý pro produkci NO (Lima-Junior et al., 2013) a tak může způsobovat i poškození hostitelovy tkáně (Chao et al., 1996). Zároveň vyvolává sekreci IL-17 mimo jiné $\gamma\delta$ T lymfocyty a stimuluje proliferaci a akumulaci neutrofilů (Coffelt et al., 2015).

Neutrofilů by mohly být významnou složkou granulocytů infiltrujících nervovou tkáň zejména 14 dpi (Macháček et al. 2018). V tento interval a 21 dpi jsme pozorovali největší zastoupení IL-17 v širším okolí okolo schistosomul. Nicméně v některých případech byla intenzita signálu okolo parazita v bílé hmotě srovnatelná se signálem pozadí v šedé hmotě, kde se ovšem parazit nenacházel. Na produkci IL-17 se z části podílely námi pozorované mikroglie, které jsou tímto cytokinem aktivovány (Yu et al., 2016). Tuto funkci zmíněného cytokinu podporuje i jeho přítomnost 7 dpi jen v těsném okolí parazita. IL-17 se tedy aktivací mikroglíí pravděpodobně podílí na destrukci patogenu v CNS, nicméně tato reakce je stejně jako v případě signalizace IL-1 β dvojsečná, jelikož vede také k poškození neuronů (Yu et al., 2016).

Produkce pozorovaných cytokinů nasvědčovala provázanosti s aktivitou gliových buněk, a byla tedy pozorována také nejdříve 7 dpi. Prozánětlivé cytokiny IL-1 β a IL-17 nejhojněji zastoupeny 14 a 21 dpi se svojí aktivitou mohou podílet na destrukci parazita, zároveň ale také na destrukci neuronů. Produkce těchto cytokinů může být omezena cytokinem IL-4 a poškození nervové tkáně může zmírňovat IL-6 působením na astrocyty a indukci tvorby gliové jizvy. V budoucnu by po detailnějším popisu cytokinového profilu pomocí v naší laboratoři právě probíhající transkriptomické analýzy bylo vhodné funkci vybraných cytokinů ověřit s využitím imunodeficientních myši pro daný cytokin.

5.3. Periferní imunitní odpověď

Vliv zánětu v CNS na periferní imunitní odpověď jsme posuzovali ve slezině, jakožto největším lymfatickém orgánu těla. V průběhu infekce *T. regenti* se hmotnost sleziny i množství T lymfocytů zvyšovalo. Oproti tomu v případě poškození mozku mrtvicí nebo migrací larev hlístice *Angiostrongylus cantonensis* hmotnost sleziny klesala a došlo i k výraznému snížení množství splenocytů v důsledku apoptózy. Ačkoliv procentuálního zastoupení T lymfocytů se zvyšovalo, bylo to patrně způsobeno zvyšujícím se množstvím Treg buněk (Offner et al., 2006; Liu et al., 2017). Zánět a poškození CNS v případě infekce *T. regenti* pravděpodobně není tak závažné jako ve zmíněných případech. Proto nedochází ke zvýšené tvorbě Treg buněk s protektivní funkcí. Na druhou stranu ložisko onemocnění není izolováno od zdravé tkáně a může se šířit dál. Dominance Treg buněk v periferní krvi byla pozorována i v případě lidské asymptomatické NCC (Adalid-Peralta et al., 2012; Arce-Sillas et al., 2016), zatímco v případě symptomatických nákaz naopak dominovala prozánětlivá Th1 a Th17 odpověď (Verma et al., 2011).

Pro detailní charakteristiku buněk sleziny v průběhu infekce *T. regenti* byla využita fenotypizace T lymfocytů pomocí průtokového cytometru, což je v naší laboratoři nově zaváděná metoda. Současná analýza TF a cytokinů v jednom experimentu není ovšem běžná a při použití pufru optimalizovaného pro měření TF mohou být výtěžky u cytokinů nižší. I když se nám tímto postupem podařilo detekovat každý ze sledovaných cytokinů, bude třeba tento protokol ještě optimalizovat (např. ověřit vhodnost dalších pufrů a porovnat získané výsledky). S ohledem na tuto skutečnost byl každý ze sledovaných parametrů (TF, cytokin) hodnocen primárně zvlášť, dvojité pozitivní populace byly sledovány až druhotně. Nízký počet statisticky signifikantních výsledků byl ovlivněn zvolením přísného statistického testování, proto jsou ve výsledcích uvedeny i p hodnoty vyšší než 0,05.

V časně fázi infekce (3 dpi) jsme ve slezině pozorovali pokles zastoupení TF typických pro Th1, Th2 i Th17 oproti zdravým kontrolám, zastoupení cytokiny produkujících buněk zůstalo nízké a nezměněné. V tuto dobu se většina parazitů nachází v kůži a uniknuvší schistosomula vstupují do CNS, aniž by způsobovala viditelnou buněčnou imunitní odpověď (Kouřilová et al., 2004b; Lichtenbergová et al., 2011). Splenocyty tedy patrně reagují na schistosomula zachycená po penetraci do hostitele v kůži. Předpokládáme, že na snížení zastoupení buněk pozitivních na sledované TF může mít podíl odliv maturovaných T lymfocytů do lymfatických uzlin spádových pro

postižené oblasti kůže. V nich byla pozorována smíšená Th1/Th2/Treg reakce (Kouřilová et al., 2004b). V době publikace tohoto experimentu ovšem nebyla známa Th17 populace, takže výsledky pro ni nejsou popsány. Této hypotéze však nenasvědčuje nezměněné zastoupení Foxp3+ buněk, jelikož jejich zastoupení bylo 3 dpi srovnatelné se zdravou kontrolou.

V dalších fázích infekce (7 a 14 dpi) jsme detekovali nárůst zastoupení buněk produkujících všechny pozorované cytokiny. Nejmarkantnější byl nárůst u IFN γ + a IL-4+ buněk s vrcholem 7, resp. 14 dpi. Tato reakce už byla patrně způsobena zánětem probíhajícím v míše, který kulminuje 14 dpi (Lichtenbergová et al. 2011, Macháček et al. 2018). Hypotéze, že je sledovaná odpověď splenocytů reakcí již na infekci v CNS, napovídá skutečnost, že hodnoty IL-4 i IL-10 v kožních spádových lymfatických uzlinách 8 dpi už klesaly (Kouřilová et al., 2004b). Pro potvrzení hypotézy o vlivu zánětu v CNS způsobeného *T. regenti* a vyloučení vlivu imunitní odpovědi v kůži by však vhodné provést paralelní srovnání T lymfocytů ze spádových uzlin pro kůži a CNS.

Překvapivé bylo zjištění, že postupný nárůst IL-4+ buněk nekoreloval s dynamikou exprese TF GATA-3, typického pro Th2. Procentuální zastoupení GATA-3 bylo 3 a 14 dpi výrazně nižší oproti ostatním časovým intervalům. Tento jev může být způsoben ukončením exprese tohoto TF (a tedy i transkripce daného cytokinu) před měřeným intervalem; cytokin je však v buňce stále přítomen. Podobný rozpor byl pozorován i u králíků nakažených *S. japonicum*, u nichž docházelo ke snížení exprese T-bet ale hladina IFN γ v séru se neměnila. V případě markerů Th2 populace byl pozorován pokles hladiny IL-4 ačkoliv exprese GATA-3 se zvyšovala (Farwa et al., 2018). Podobnou situaci jsme pozorovali i v případě Th17 a Treg lymfocytů 14 dpi, kdy zastoupení TF bylo signifikantně nejnižší, ale cytokinu naopak nejvyšší. Pozitivní korelace byla tedy pozorována jen v případě Th1 markerů. Obvykle se fenotypizace T lymfocytů provádí jen na základě jednoho z parametrů (cytokiny nebo TF). Recentní publikace i naše pozorování naznačují, že výsledky jen z jednoho parametru mohou být zavádějící.

T-bet+ a IFN γ + buňky jsme pozorovali i v případě CD4- T lymfocytů, které nejspíš reprezentují CD8+ T lymfocyty. Dynamika jejich produkce v průběhu infekce byla podobná jako v případě Th1 buněk. Ačkoliv jsou cytotoxické CD8+ T lymfocyty obecně spjaté spíše s virovou infekcí, vykazovaly tento fenotyp i myší splenocyty po stimulaci vaječnými antigeny *S. mansoni* (Pancre et al., 1999). Navíc bylo jejich zvyšující se množství ve slezině pozorováno i *in vivo* v případě chronické střevní schistosomózy,

kde autoři předpokládali jejich důležitý význam v patologii nákazy (Li et al., 2015), aniž by však nastínili konkrétní mechanismus.

Zánět v CNS má tedy patrně vliv i na periferní imunitní odpověď, ačkoliv získaná data z detekce TF nejsou zcela jednoznačná. Produkce cytokinů $\text{IFN}\gamma$ i IL-4 T lymfocyty ve slezině koreluje s nástupem zánětu v CNS, resp. jeho vrcholem 14 dpi. Nárůst IL-4+ buněk s vrcholem 14 dpi svědčí o trendu regulace zánětu v CNS a bylo by vhodné doplnit IHC pozorování cytokinů v okolí degradujícího parazita v míšním parenchymu, kvůli potvrzení pravděpodobné přítomnosti tohoto cytokinu. Pro detekci IL-10 a IL-17 by bylo vhodné modifikovat protokol např. delší dobou stimulace buněk nebo zvolením jiného pufru pro inkubaci buněk. V pozdější fázi infekce (21 dpi) se zdá, že hladiny TF i cytokinů se blíží hodnotám zdravých myší, nicméně pro ověření tohoto trendu by bylo vhodné přidat další interval měření.

6. Závěr

Motolice *T. regenti* představuje zajímavý model pro výzkum neuroinfekcí, avšak dosud nebyla k dispozici data o cytokinech produkovaných při infekci náhodných hostitelů. Cílem této práce proto bylo charakterizovat migraci *T. regenti* v myších kmene C57BL/6J (vč. související reakce vybraných gliových buněk) a dále na příkladu vybraných cytokinů popsat buněčnou imunitní odpověď těchto hostitelů jednak v CNS, jednak ve slezině.

V rámci této práce bylo dosaženo zejména těchto výsledků:

- Byla srovnána migrace schistosomul, provedena jejich kvantifikace a popsána reakce astrocytů a mikroglií v myším kmenu C57BL/6J v porovnání s dříve využívaným kmenem BALB/c. Tyto kmeny se ve sledovaných parametrech neliší.
- Přítomnost cytokinů v CNS byla provázána s aktivitou gliových buněk a zaznamenána nejdříve 7 dpi. Smíšená imunitní odpověď v okolí parazitů svědčila jak o zánětlivé reakci s přítomností IL-1 β a IL-17, tak i pravděpodobné snaze o její regulaci IL-4. Zároveň se v míše vyskytoval i IL-6 důležitý pro hojení CNS.
- Vliv zánětu v CNS na periferní imunitní odpověď byl potvrzen zvýšenou produkcí cytokinů (zejména IFN γ a IL-4) T lymfocyty ve slezině infikovaných myší v době, kdy zánět míše dosahuje svého vrcholu.

V rámci této diplomové práce byly prohloubeny znalosti o buněčné imunitní odpovědi savců na infekci ptačí schistosomou *T. regenti*, a to jak v CNS, tak ve slezině. Získaná data o polarizaci cytokinové imunitní odpovědi poslouží pro další studium této problematiky v rámci probíhajícího projektu zaměřeného na transkriptomickou analýzu infikované myší míchy.

7. Použitá literatura

- Adalid-Peralta, L.; Fleury, A.; García-Ibarra, T. M.; Hernández, M.; Parkhouse, M.; Crispín, J. C.; Voltaire-Proaño, J.; Cárdenas, G.; Fragoso, G.; Sciutto, E., 2012:** Human neurocysticercosis: In vivo expansion of peripheral regulatory T cells and their recruitment in the central nervous system. *Journal of Parasitology*,98:1,142–148.
- Akiyama, H.; McGeer, P. L., 1990:** Brain microglia constitutively express β -2 integrins. *Journal of Neuroimmunology*,30:1,81–93.
- Alvarez, J. I.; Colegial, C. H.; Castao, C. A.; Trujillo, J.; Teale, J. M.; Restrepo, B. I., 2002:** The human nervous tissue in proximity to granulomatous lesions induced by *Taenia solium* metacestodes displays an active response. *Journal of Neuroimmunology*,127:1,139–144.
- Alvarez, J. I.; Teale, J. M., 2006:** Breakdown of the blood brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier is associated with differential leukocyte migration in distinct compartments of the CNS during the course of murine NCC. *Journal of Neuroimmunology*,173:1-2,45–55.
- Alvarez, J. I.; Mishra, B. B.; Gundra, U. M.; Mishra, P. K.; Teale, J. M., 2010:** *Mesocostoides corti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. *Parasitology*,137:3,359–372.
- Amit, P.; Prasad, K. N.; Kumar, G. R.; Shweta, T.; Sanjeev, J.; Kumar, P. V.; Mukesh, T., 2011:** Immune response to different fractions of *Taenia solium* cyst fluid antigens in patients with neurocysticercosis. *Experimental Parasitology*,127:3,687–692.
- Arce-Sillas, A.; Álvarez-Luquín, D. D.; Cárdenas, G.; Casanova-Hernández, D.; Fragoso, G.; Hernández, M.; Proaño Narváez, J. V.; García-Vázquez, F.; Fleury, A.; Sciutto, E.; Adalid-Peralta, L., 2016:** Interleukin 10 and dendritic cells are the main suppression mediators of regulatory T cells in human neurocysticercosis. *Clinical and Experimental Immunology*,183:2,271–279.
- Arora, N.; Tripathi, S.; Kumar, P.; Mondal, P.; Mishra, A.; Prasad, A., 2017:** Recent advancements and new perspectives in animal models for Neurocysticercosis immunopathogenesis. *Parasite Immunology*,39:7,1-6.*
- Bächli, H.; Minet, J. C.; Gratzl, O., 2004:** Cerebral toxocariasis: a possible cause of epileptic seizure in children. *Child's nervous system*,20:7,468–472.
- Boje, K. M.; Arora, P. K., 1992:** Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Research*,587:2,250–256.*
- Bulantová, J.; Macháček, T.; Panská, L.; Krejčí, F.; Karch, J.; Jährling, N.; Saghafi, S.; Dodt, H. U.; Horák, P., 2016:** *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae): 3D imaging techniques in characterization of larval migration through the CNS of vertebrates. *Micron*,83,62–71.

- Cardona, A. E.; Restrepo, B. I.; Jaramillo, J. M.; Teale, J. M., 1999:** Development of an animal model for neurocysticercosis: immune response in the central nervous system is characterized by a predominance of $\gamma \delta$ T cells. *The Journal of Immunology.*,162:2,995–1002.
- Cardona, A. E.; Teale, J. M., 2002:** Gamma/delta T cell-deficient mice exhibit reduced disease severity and decreased inflammatory response in the brain in murine neurocysticercosis. *The Journal of Immunology.*,169:6,3163–3171.
- Chanová, M.; Hrdý, J., 2016:** Impact of induced Th 1/Th 2 shift on *Trichobilharzia regenti* infection in mice. *Folia Biologica.*,33,26–33.
- Chao, C. C.; Hu, S.; Sheng, W. S.; Bu, D.; Bukrinsky, M. I.; Peterson, P. K., 1996:** Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. *Glia.*,16:3,276–284.
- Chavarria, A.; Roger, B.; Fragoso, G.; Tapia, G.; Fleury, A.; Dumas, M.; Desein, A.; Larralde, C.; Sciutto, E., 2003:** TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Microbes and Infection.*,5:12,1109–1115.
- Chavarria, A.; Fleury, A.; García, E.; Márquez, C.; Fragoso, G.; Sciutto, E., 2005:** Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clinical Immunology.*,116:3,271–278.
- Chavarria, A.; Fleury, A.; Bobes, R. J.; Morales, J.; Fragoso, G.; Sciutto, E., 2006:** A depressed peripheral cellular immune response is related to symptomatic neurocysticercosis. *Microbes and Infection.*,8:4,1082–1089.
- Choi, S. S.; Lee, H. J.; Lim, I.; Satoh, J. I.; Kim, S. U., 2014:** Human astrocytes: Secretome profiles of cytokines and chemokines. *PLoS ONE.*,9:4,1-8
- Chuah, C.; Jones, M. K.; McManus, D. P.; Nawaratna, S. K.; Burke, M. L.; Owen, H. C.; Ramm, G. A.; Gobert, G. N., 2016:** Characterising granuloma regression and liver recovery in a murine model of schistosomiasis japonica. *International Journal for Parasitology.*,46:4,239–252.
- Coffelt, S. B.; Kersten, K.; Doornebal, C. W.; Weiden, J.; Vrijland, K.; Hau, C. S.; Verstegen, N. J. M.; Ciampricotti, M.; Hawinkels, L. J. A. C.; Jonkers, J.; de Visser, K. E., 2015:** IL-17-producing $\gamma \delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature.*,522:7556,345–348.
- D’Agostino, P. M.; Gottfried-Blackmore, A.; Anandasabapathy, N.; Bulloch, K., 2012:** Brain dendritic cells: biology and pathology. *Acta Neuropathologica.*,124:5,599–614.*
- De Almeida Kruschewsky, R.; Cardoso, L. S.; Fernandes, J. S.; Da Paixão De Souza, R.; Lopes, D. M.; De Carvalho, O. A. M.; Araujo, M. I., 2016:** Immunological profile in individuals with schistosomal myeloradiculopathy. *NeuroImmunoModulation.*,2:33,157–167.
- De Buck, M.; Berghmans, N.; Portner, N.; Vanbrabant, L.; Cockx, M.; Struyf, S.; Opendakker, G.; Proost, P.; Van Damme, J.; Gouwy, M., 2015:** Serum amyloid

A1 induces paracrine IL-8/CXCL8 via TLR2 and directly synergizes with this chemokine via CXCR2 and formyl peptide receptor 2 to recruit neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*,98:6,1049–1060.

De Santana, J. M.; Viana, V. A. S.; Santos, J. A. C.; da Cruz, K. M. L.; de Araújo, K. C. G. M., 2017: Development of an experimental model of schistosomal myeloradiculopathy. *Acta Tropica*,167,142–147.

Deshayes, S.; Bonhomme, J.; de La Blanchardière, A., 2016: Neurotoxocariasis: a systematic literature review. *Infection*,44:5,565–574.*

Dolečková, K.; Kašný, M.; Mikeš, L.; Cartwright, J.; Jedelský, P.; Schneider, E. L.; Dvořák, J.; Mountford, A. P.; Craik, C. S.; Horák, P., 2009: The functional expression and characterisation of a cysteine peptidase from the invasive stage of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*. *International Journal for Parasitology*,39:2,201–211.

Epe, C.; Sabel, T.; Schnieder, T.; Stoye, M., 1994: The behavior and pathogenicity of *Toxacara canis* larvae in mice of different strains. *Parasitology Research*,80:8,691–695.

Fallon, P. G.; Richardson, E. J.; McKenzie, G. J.; McKenzie, a N., 2000: Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *Journal of immunology*,164:5,2585–2591.

Fan, C. K.; Holland, C. V.; Loxton, K.; Barghouth, U., 2015: Cerebral toxocariasis: Silent progression to neurodegenerative disorders? *Clinical Microbiology Reviews*,28:3,663–686.*

Farwa, A.; He, C.; Xia, L.; Zhou, H., 2018: Immune modulation of Th1, Th2, and T-reg transcriptional factors differing from cytokine levels in *Schistosoma japonicum* infection. *Parasitology Research*,117:1,115–126.

Ferrari, T. C. A.; Moreira, P. R. R.; Cunha, A. S., 2004: Spinal cord schistosomiasis: A prospective study of 63 cases emphasizing clinical and therapeutic aspects. *Journal of Clinical Neuroscience*,11:3,246–253.

Ferrari, T. C. A.; Moreira, P. R. R.; Sampaio, M. J.; da Cunha, A. S.; de Oliveira, J. T.; Gazzinelli, G.; Correa-Oliveira, R., 2006: Intrathecal cytokines in spinal cord schistosomiasis. *Journal of Neuroimmunology*,177:1–2,136–141.

Finsterer, J.; Auer, H., 2013: Parasitoses of the human central nervous system. *Journal of Helminthology*,87:3,257–270.*

Fioretti, D.; Moretti, A.; Mughetti, L.; Bruschi, F., 1989: Eosinophilia, granuloma formation, migratory behaviour of second stage larvae in murine *Toxacara canis* infection. Effect of the inoculum size. *Parassitologia*,31:(2-3),153–166.

Groux, H.; Garra, A.; Bigler, M.; Rouleau, M.; Antonenko, S.; Vries, J. E.; Roncarolo, M. G. G., 1997: A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*,389:October,737–742.

- Hamilton, C. M.; Stafford, P.; Pinelli, E.; Holland, C. V., 2006:** A murine model for cerebral toxocariasis: Characterization of host susceptibility and behaviour. *Parasitology*,132:6,791–801.
- Hamilton, C. M.; Brandes, S.; Holland, C. V.; Pinelli, E., 2008:** Cytokine expression in the brains of *Toxocara canis*-infected mice. *Parasite Immunology*,30:3,181–185.
- Hanisch, U. K., 2002:** Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*,40:2,140–155.*
- Horák, P.; Dvořák, J.; Kolářová, L.; Trefil, L., 1999:** *Trichobilharzia regenti*, a pathogen of the avian and mammalian central nervous systems. *Parasitology*,119 (Pt 6):December,577–581.
- Hrádková, K.; Horák, P., 2002:** Neurotropic behaviour of *Trichobilharzia regenti* in ducks and mice. *Journal of helminthology*,76:2,137–141.
- Ito, D.; Imai, Y.; Ohsawa, K.; Nakajima, K.; Fukuuchi, Y.; Kohsaka, S., 1998:** Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research*,57:1,1–9.
- Janecek, E.; Waindok, P.; Bankstahl, M.; Strube, C., 2017:** Abnormal neurobehaviour and impaired memory function as a consequence of *Toxocara canis*- as well as *Toxocara cati*-induced neurotoxocarosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*,11:5,1–19.
- Kettenmann, H.; Ransom, R.B., 2013:** Neuroglia, 3. vydání, Oxford: Oxford University Press, New York., ISBN 9780199794591*
- Kolářová, L.; Horák, P.; Čada, F., 2001:** Histopathology of CNS and nasal infections caused by *Trichobilharzia regenti* in vertebrates. *Parasitology Research*,87:8,644–650.
- Kouřilová, P.; Syrůček, M.; Kolářová, L., 2004a:** The severity of mouse pathologies caused by the bird schistosome *Trichobilharzia regenti* in relation to host immune status. *Parasitology Research*,93:1,8–16.
- Kouřilová, P.; Hogg, K. G.; Kolarova, L.; Mountford, A. P., 2004b:** Cercarial dermatitis caused by bird schistosomes comprises both immediate and late phase cutaneous hypersensitivity reactions. *The Journal of Immunology*,172:6,3766–3774.
- Krčmářová, V. 2017:** Ultrastrukturální interakce larev ptačích schistosom *Trichobilharzia regenti* s imunitními buňkami nervového systému hostitele. Praha, 2017. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce RNDr. Jana Bulantová, Ph.D.
- Kulkarni, a B.; Huh, C. G.; Becker, D.; Geiser, a; Lyght, M.; Flanders, K. C.; Roberts, a B.; Sporn, M. B.; Ward, J. M.; Karlsson, S., 1993:** Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

States of America.,90:2,770–774.

- Lei, T.; Shu, K.; Chen, X.; Li, L., 2008:** Surgical treatment of epilepsy with chronic cerebral granuloma caused by *Schistosoma japonicum*. *Epilepsia.*,49:1,73–79.
- Li, N.; Ji, P. yu; Song, L. gui; Lei, J. xia; Lv, Z. yue; Wu, Z. dao; Shao, X.; Sun, X., 2015:** The expression of molecule CD28 and CD38 on CD4+/CD8+ T lymphocytes in thymus and spleen elicited by *Schistosoma japonicum* infection in mice model. *Parasitology Research.*,114:8,3047–3058.
- Liao, C. W.; Fan, C. K.; Kao, T. C.; Ji, D. D.; Su, K. E.; Lin, Y. H.; Cho, W. L., 2008:** Brain injury-associated biomarkers of TGF-beta1, S100B, GFAP, NF-L, tTG, AbetaPP, and tau were concomitantly enhanced and the UPS was impaired during acute brain injury caused by *Toxocara canis* in mice. *BMC infectious diseases.*,8:1,84.
- Lichtenbergová, L.; Lassmann, H.; Jones, M. K.; Kolářová, L.; Horák, P., 2011:** *Trichobilharzia regenti*: Host immune response in the pathogenesis of neuroinfection in mice. *Experimental Parasitology.*,128:4,328–335.
- Lima-Junior, D. S.; Costa, D. L.; Carregaro, V.; Cunha, L. D.; Silva, A. L. N.; Mineo, T. W. P.; Gutierrez, F. R. S.; Bellio, M.; Bortoluci, K. R.; Flavell, R. A.; Bozza, M. T.; Silva, J. S.; Zamboni, D. S., 2013:** Inflammasome-derived IL-1 β production induces NO mediated resistance to *Leishmania*. *Nature Medicine.*,19:7,909–915.
- Liu, Z.; Wu, Y.; Feng, Y.; Wu, F.; Liu, R. feng; Wang, L. fu, 2017:** Spleen atrophy related immune system changes attributed to infection of *Angiostrongylus cantonensis* in mouse model. *Parasitology Research.*,577–587.
- Louveau, A.; Harris, T. H.; Kipnis, J., 2015:** Revisiting the mechanisms of CNS immune privilege. *Trends in Immunology.*,36:10,569–577.*
- Macháček, T.; Immig, K.; Horák, P., 2018:** Dynamics of immune cells in the CNS of mice after infection by *Trichobilharzia regenti*. In: Bulantová, J., Macháček T., ed. *24th Helminthological Days: Programme & Abstracts*. Praha: Charles University, Faculty of Science, s. 29. ISBN 978-80-7444-057-1.
- Macháček, T.; Panská, L.; Dvořáková, H.; Horák, P., 2016:** Nitric oxide and cytokine production by glial cells exposed in vitro to neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*. *Parasites & Vectors.*,9:1,579.
- Mariani, M. M.; Kielian, T., 2009:** Microglia in infectious diseases of the central nervous system. *Journal of Neuroimmune Pharmacology.*,4:4,448–461.*
- McSorley, H. J.; Maizels, R. M., 2012:** Helminth infections and host immune regulation. *Clinical Microbiology Reviews.*,25:4,585–608.*
- Mishra, B. B.; Gundra, U. M.; Wong, K.; Teale, J. M., 2009:** MyD88-deficient mice exhibit decreased parasite-induced immune responses but reduced disease severity in a murine model of neurocysticercosis. *Infection and Immunity.*,77:12,5369–5379.

- Mishra, B. B.; Gundra, U. M.; Teale, J. M., 2011:** STAT6^{-/-} mice exhibit decreased cells with alternatively activated macrophage phenotypes and enhanced disease severity in murine neurocysticercosis. *Journal of Neuroimmunology*,232:1–2,26–34.
- Offner, H.; Subramanian, S.; Parker, S. M.; Wang, C.; Afentoulis, M. E.; Lewis, A.; Vandenbark, A.; Hurn, P. D., 2006:** Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *The Journal of Immunology*,176,6523–6531.
- Othman, A. a.; Abdel-Aleem, G. a.; Saied, E. M.; Mayah, W. W.; Elatrash, A. M., 2010:** Biochemical and immunopathological changes in experimental neurotoxocariasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*,172:1,1–8.
- Pancré, V.; Delacre, M.; Herno, J.; Auriault, C., 1999:** Schistosomal egg antigen-responsive CD8 T-cell population in *Schistosoma mansoni*-infected BALB/c mice. *Immunology*,98:4,525–534.
- Pelly, V. S.; Kannan, Y.; Coomes, S. M.; Entwistle, L. J.; Rückerl, D.; Seddon, B.; MacDonald, A. S.; McKenzie, A.; Wilson, M. S., 2016:** IL-4-producing ILC2s are required for the differentiation of TH2 cells following *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Mucosal Immunology*,9:6,1407–1417.
- Popovich, P. G.; Wei, P.; Stokes, B. T., 1997:** Cellular inflammatory response after spinal cord injury in sprague-dawley and lewis rats. *The Journal of Comparative Neurology*,377:3,443–464.
- Prasad, A.; Prasad, K. N.; Gupta, R. K.; Pradhan, S., 2009:** Increased expression of ICAM-1 among symptomatic neurocysticercosis. *Journal of Neuroimmunology*,206:1–2,118–120.
- Provost, V.; Larose, M. C.; Langlois, A.; Rola-Pleszczynski, M.; Flamand, N.; Laviolette, M., 2013:** CCL26/eotaxin-3 is more effective to induce the migration of eosinophils of asthmatics than CCL11/eotaxin-1 and CCL24/eotaxin-2. *Journal of Leukocyte Biology*,94:2,213–222.
- Restrepo, B. I.; Llaguno, P.; Sandoval, M. A.; Enciso, J. A.; Teale, J. M., 1998:** Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: Central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. *Journal of Neuroimmunology*,89:1–2,64–72.
- Restrepo, B. I.; Alvarez, J. I.; Castaño, J. a; Arias, F.; Restrepo, M.; Trujillo, J.; Carlos, H.; Teale, J. M.; Arias, L. F.; Colegial, C. H., 2001:** Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile.,69:7,4554–4560.
- Roberts, C. W.; Ferguson, D. J. P.; Jebbari, H.; Satoskar, A.; Bluethmann, H.; Alexander, J., 1996:** Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and Immunity*,64:3,897–904.

- Rodrigues, V.; De-Mello, F. A.; Magalhães, E. P.; Ribeiro, S. B. F.; Marquez, J. O., 2000:** Interleukin-5 and interleukin-10 are major cytokines in cerebrospinal fluid from patients with active neurocysticercosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.*,33:9,1059–1063.
- Roitbak, T.; Syková, E., 1999:** Diffusion barriers evoked in the rat cortex by reactive astrogliosis. *Glia.*,48:February,40–48.
- Seki, T.; Kumagai, T.; Kwansa-Bentum, B.; Furushima-Shimogawara, R.; Anyan, W. K.; Miyazawa, Y.; Iwakura, Y.; Ohta, N., 2012:** Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 suppress excessive neutrophil infiltration and hepatocyte damage during acute murine schistosomiasis japonica. *Infection and Immunity.*,80:1,159–168.
- Sher, A; Coffman, R. L.; Hieny, S.; Scott, P.; Cheever, A. W., 1990:** Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*,87:1,61–65.
- Sofroniew, M. V.; Vinters, H. V., 2010:** Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica.*,119:1,7–35.*
- Sousa-Pereira, S. R.; Teixeira, A. L.; Silva, L. C. S.; Souza, A. L. S.; Antunes, C. M.; Teixeira, M. M.; Lambertucci, J. R., 2006:** Serum and cerebral spinal fluid levels of chemokines and Th2 cytokines in *Schistosoma mansoni* myeloradiculopathy. *Parasite Immunology.*,28:9,473–478.
- Streit, W. J.; Kreutzberg, G. W., 1988:** Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. *Journal of Comparative Neurology.*,268:2,248–263.
- Swartz, K. R.; Liu, F.; Sewell, D.; Schochet, T.; Campbell, I.; Sandor, M.; Fabry, Z., 2001:** Interleukin-6 promotes post-traumatic healing in the central nervous system. *Brain Research.*,896:1–2,86–95.
- Taylor, M. D.; van der Werf, N.; Maizels, R. M., 2012:** T cells in helminth infection: The regulators and the regulated. *Trends in Immunology.*,33:4,181–189.*
- Tuero, I.; Palma, S.; Cabeza, F.; Saleemi, S.; Rodriguez, S.; Gonzales, I.; Mayta, H.; Mahanty, S.; Garcia, H. H.; Gilman, R. H., 2015:** A comparative study of peripheral immune responses to *Taenia solium* in individuals with parenchymal and subarachnoid neurocysticercosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases.*,9:10,1–15.
- Uddin, J.; Garcia, H. H.; Gilman, R. H.; Gonzalez, A. E.; Friedland, J. S., 2005:** Monocyte-astrocyte networks and the regulation of chemokine secretion in neurocysticercosis. *Journal of immunology.*,175:5,3273–3281.
- Uddin, J.; Gonzalez, A. E.; Gilman, R. H.; Thomas, L. H.; Rodriguez, S.; Evans, C. A. W.; Remick, D. G.; Garcia, H. H.; Friedland, J. S., 2010:** Mechanisms regulating monocyte CXCL8 secretion in neurocysticercosis and the effect of antiparasitic therapy. *The Journal of Immunology.*,185:7,4478–4484.

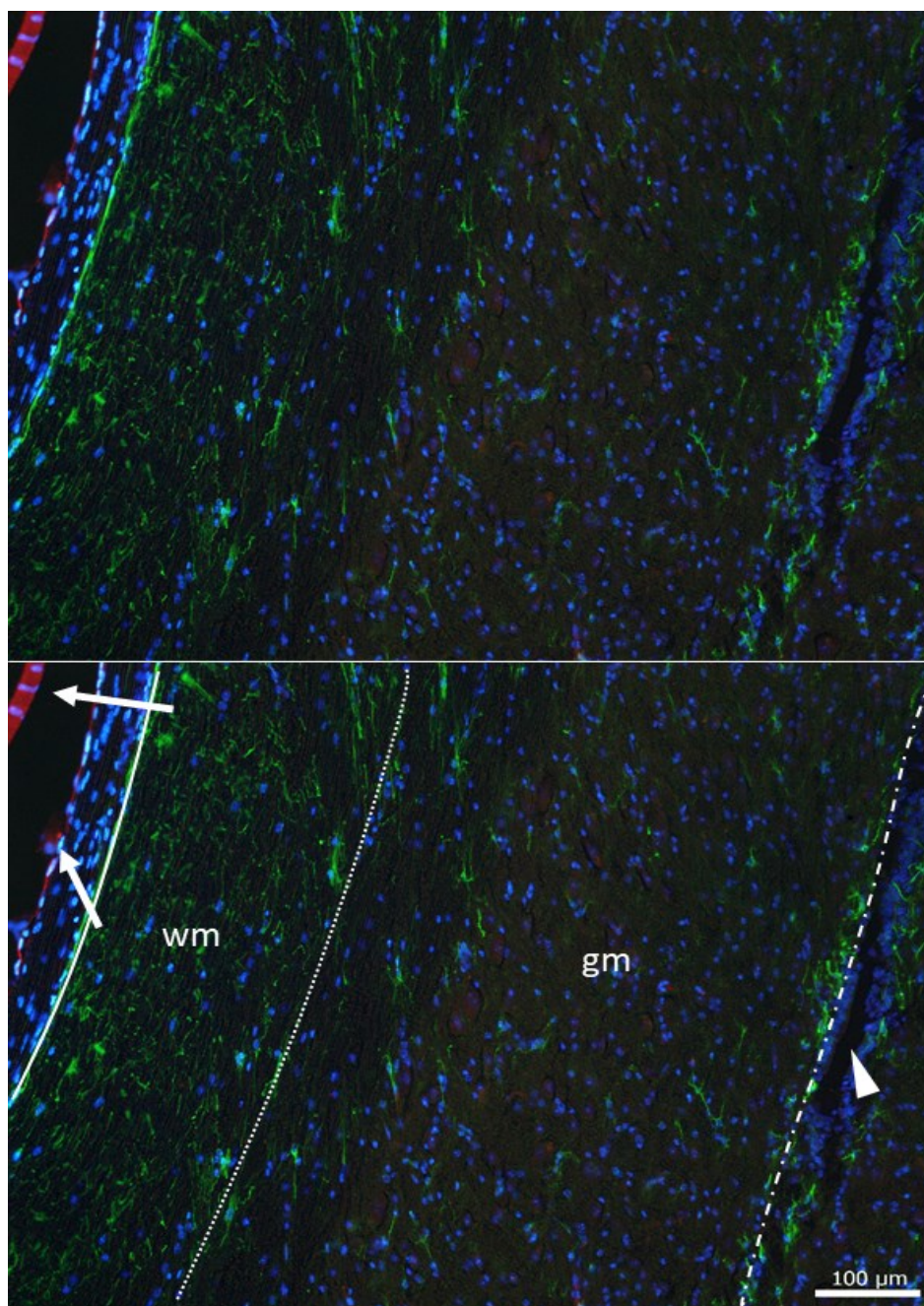
- Verma, A.; Prasad, K. N.; Cheekatla, S. S.; Nyati, K. K.; Paliwal, V. K.; Gupta, R. K., 2011:** Immune response in symptomatic and asymptomatic neurocysticercosis. *Medical Microbiology and Immunology.*,200:4,255–261.
- Wang, P.; Wang, D.; Chen, S. J.; Wu, M. C.; Cheng, X. L.; Li, J. C.; Chen, T. X.; Zhu, Z. S., 2011:** Establishment of a cerebral schistosomiasis experimental model in rabbits. *Neuroscience Bulletin.*,27:2,91–98.
- Yu, A.; Duan, H.; Zhang, T.; Pan, Y.; Kou, Z.; Zhang, X.; Lu, Y.; Wang, S.; Yang, Z., 2016:** IL-17A promotes microglial activation and neuroinflammation in mouse models of intracerebral haemorrhage. *Molecular Immunology.*,73,151–157.

*) sekundární zdroje

8. Přílohy

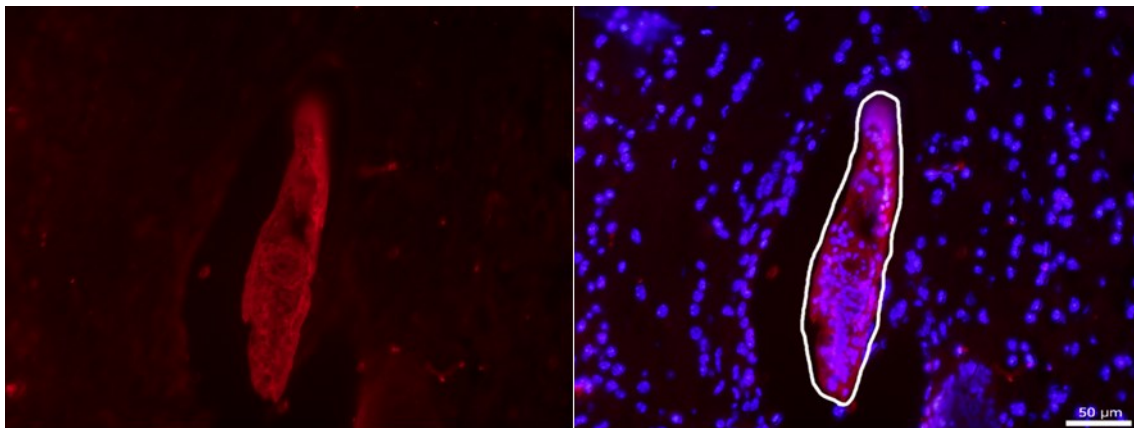
8.1. IHC experimenty

Vzorové řezy míchy ze zdravých myší byly využity pro rozlišení šedé a bílé hmoty (gm, resp. wm) (viz Obr. p1). Zároveň byla potvrzena vazba protilátek proti cytokinům do míšních meningů i u zdravých myší.



Obr. p1: Mícha ze zdravé myši; Protilátka proti cytokinu (**IL-6**); astrocyty (**GFAP**); jádra (**DAPI**); šipky — míšní meningy; trojúhelník — centrální kanál; wm — bílá hmota; gm — šedá hmota; plná čára mezi meningy a wm — *glia limitans*; tečkovaná čára — rozhraní wm/gm; čerchovaná čára — rozhraní gm/centrální kanál

Vyloučení falešně pozitivních výsledků v důsledku vazby králičích polyklonálních protilátek v okolí schistosomul bylo provedeno značením řezů sérem ze zdravého králíka, ve stejné koncentraci, jaká byla použita pro ředění protilátek (viz. Obr. p2).

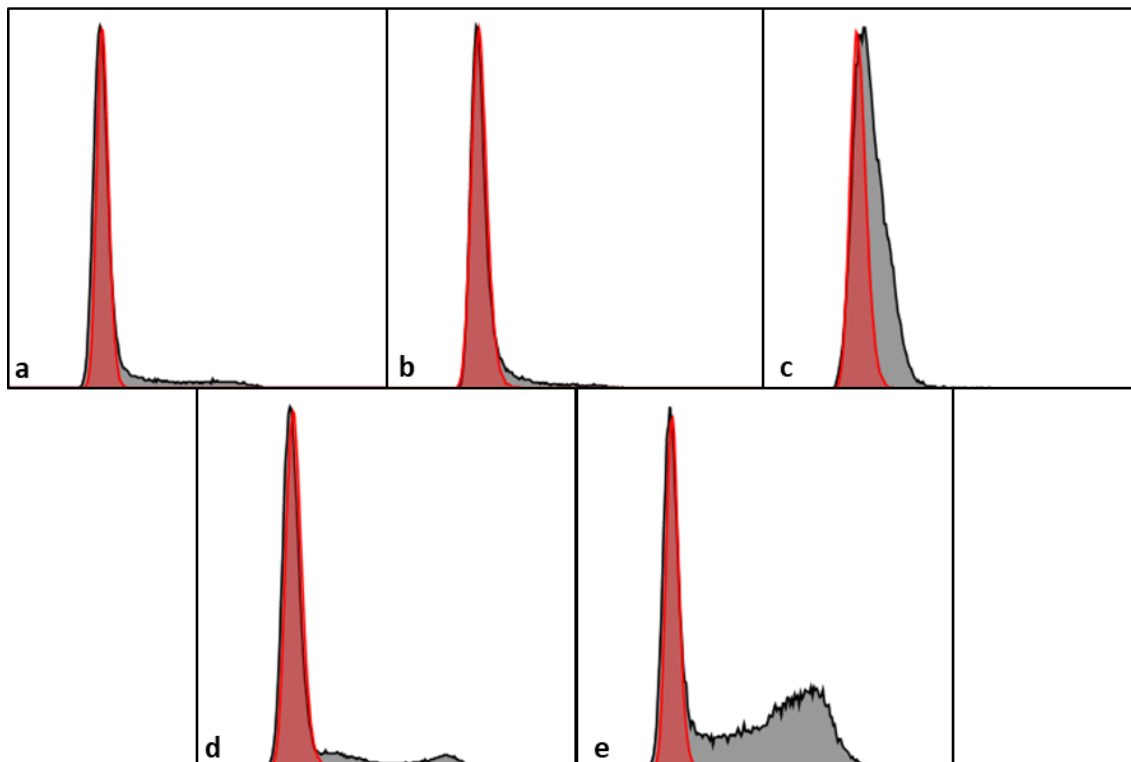


Obr. p2: Průkaz vazby králičích protilátek do schistosomula a vyloučení této vazby v jeho okolí.

Protilátky obsažené v séru ze zdravého králíka; jádra (DAPI); schistosomulum bíle orámováno

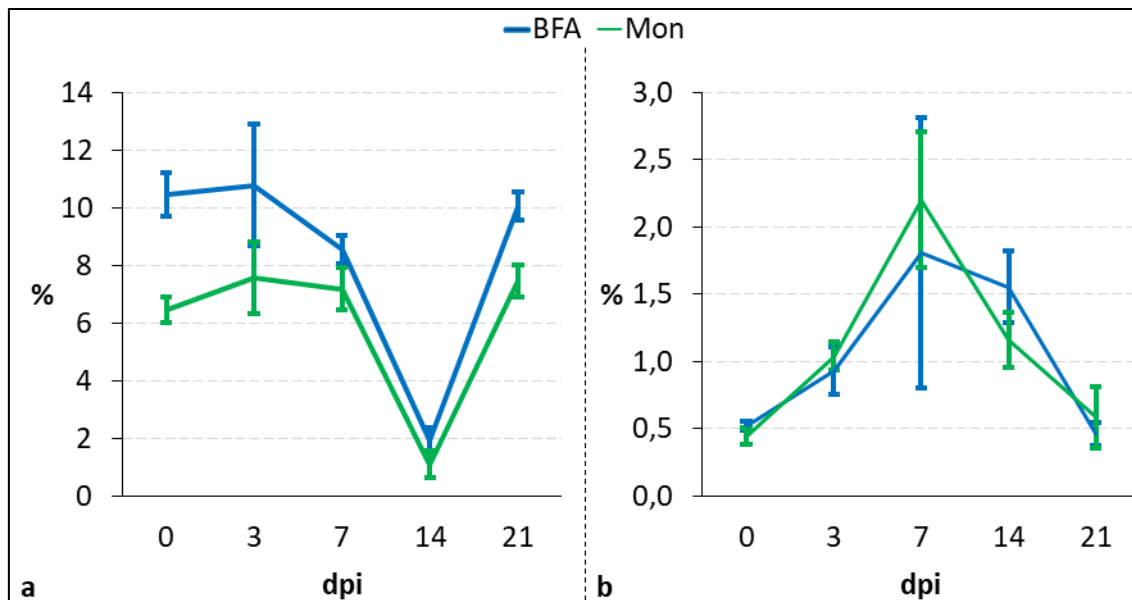
8.2. Cytometrické experimenty

Správnost stanovení hranice mezi pozitivní a negativní populací při gatingu byla ověřena zobrazením izotypové kontroly k příslušnému TF (viz Obr. p3)



Obr. p3: Srovnání izotypové kontroly (**červeně**) s příslušnou protilátkou stejného izotypu (**šedě**) k TF jednotlivých T lymfocytárních populací; a — Th1 (T-bet); b — Th2 (GATA-3); c — Th17 (ROR γ t); d — Treg (Foxp3); e — CD4- buňky (T-bet)

Vzhledem k nízkým výtěžkům IL-10 byl při stimulaci BFA nahrazen Mon. Kýžený výsledek tento krok ovšem nepřinesl. Zastoupení pozitivních buněk bylo podobné jako v případě použití BFA (viz Obr. p4)



Obr. p4: Porovnání procentuálního zastoupení Foxp3+ a IL-10+ buněk při stimulaci splenocytů v přítomnosti BFA nebo Mon.; a — Foxp3, b — IL-10; $n=4$; Foxp3 $r_s = 0,5852$, $p = 0,0067$; IL-10 $r_s = 0,6912$, $p = 0,0007$